

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Биологические мембраны

Методы

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

BIOLOGICAL MEMBRANES

A PRACTICAL APPROACH

Edited by J. B. C. Findlay

Department of Biochemistry, University of Leeds, Leeds LS2
9JT, UK

W. H. Evans

Medical Research Council, National Institute for Medical Research,
Mill Hill, London NW7 1AA, UK

IRL Press
Oxford Washington DC

Биологические мембраны.

Методы

Под редакцией
ДЖ. ФИНДЛЕЯ, У. ЭВАНЗА

Перевод с английского
канд. хим. наук Л. И. БАРСУКОВА,
М. Л. ВЕРХОВСКОЙ
и канд. биол. наук В. Д. СЛЕДЯ

под редакцией
д-ра биол. наук А. Д. ВИНОГРАДОВА



Москва «Мир» 1990

ББК 28.072
Б63
УДК 577.352.3

Авторы: Эванз У. Г., Морре Д. Д., О'Брайтман Э., Санделиус А. С.,
Бейлез Э. М., Ричардсон П. Дж., Луизо Дж. П., Хиггинс Д. А.,
Джонс О. Т., Эрнест Ю. П., Мак-Нэми М. Дж., Финдлей Дж. Б.,
Башфорд К. Л., Шуберт Д., Сивапрасадарао А.

Биологические мембраны. Методы: Пер. с англ./Под ред.
Б63 Дж. Б. Финдлея, У. Г. Эванза. — М.: Мир, 1990. — 424 с.,
ил.

ISBN 5-03-001317-2

Книга международного коллектива авторов (Англия, США, Швейцария, ФРГ) знакомит с современными практическими подходами к исследованию мембран животных и растительных клеток. Подробно описаны методы выделения, фракционирования и реконструкции мембран, анализ их компонентов (химический, физический и иммунологический). Рассматриваются источники возможных ошибок и артефактов. Книга относится к серии «Методы» издательства «ИРЛ Пресс» (Англия).

Для биохимиков, биофизиков, иммунологов.

Б $\frac{1903010000-282}{041(01)-90}$ 103—90

ББК 28.072

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001317-2 (русск.)
ISBN 0-947946-83-7 (англ.)

© 1987 IRL Press Limited
© перевод на русский язык
Барсуков Л. И., Верхов-
ская М. Л., Следь В. Д.,
1990 г.

Исследование биологических мембран — одна из очень быстро развивающихся областей современных естественных наук. Многочисленным научным работникам и преподавателям у нас в стране становится все труднее успевать за развитием мембранологии в лидирующих лабораториях мира. Не в последнюю очередь создавшееся положение связано с отсутствием хороших, доступных для широкого круга читателей руководств по методам, применяемым в этой области. Биологические мембраны — многокомпонентные образования, обладающие ферментативной активностью разного типа. Применительно к мембранам даже начальный этап исследования — идентификация, выделение, очистка и определение стандартных физико-химических свойств фермента — оказывается весьма сложной задачей. Фракционирование почти всегда приходится проводить в присутствии детергентов, что сильно меняет привычные для энзимологов приемы очистки. Спектральные измерения приходится выполнять в сильно рассеивающих средах. Даже определение молекулярной массы мембранных белков в присутствии додецилсульфата натрия часто оказывается непростой процедурой. Отсутствие солидной теоретической основы методических приемов, используемых при работе с биологическими мембранами, приводит к тому, что исследователь, столкнувшись с той или иной проблемой, вынужден искать подходящие методы ее решения ощупью, пытаясь по крохам извлечь полезные сведения из необозримой литературы.

Мы надеемся, что предлагаемая вниманию читателей книга, написанная авторитетными авторами, существенно облегчит эту задачу. В ней в сжатой форме суммированы методические приемы, применяемые при работе с биологическими мембранами, на основании критического анализа более тысячи оригинальных источников. Не все разделы книги равноценны. Так, главы, посвященные фракционированию мембран животных и растительных клеток, написаны с исчерпывающей полнотой, и некоторые методики можно применять без дополнительной проработки первоисточников. В то же время другие разделы, например «Био-

физические подходы к изучению биологических мембран», дают лишь общую картину методов; для их практического применения потребуется чтение дополнительной литературы или обращение к оригинальным работам и к соответствующим томам руководства *Methods in Enzymology* (S. Peter Colowick, N. O. Kaplan, eds., Academic Press, New York, London). Тем не менее мы полагаем, что появление русского перевода книги «Биологические мембраны. Методы» окажется полезным для многочисленных научных работников, преподавателей, аспирантов и студентов старших курсов, избравших областью своих профессиональных интересов увлекательное изучение биологических мембран.

А. Д. Виноградов

После нескольких десятилетий относительного затишья в 70—80-е гг. произошел резкий скачок в понимании сущности мембранных явлений. Это было связано со значительными успехами в разработке методов получения чистых мембранных фракций, выделения из них различных компонентов и изучения их структуры и свойств. Современный мембранолог должен обладать широкими познаниями в самых разных областях; это химия и биохимия липидов и белков, иммунология и сложные физические методы, включая их теоретические основы.

В отличие от большинства ранее опубликованных пособий по мембранам в этой книге основное внимание уделяется методологическим аспектам и затрагивается гораздо более широкий круг практических проблем. Неизбежным следствием такого прагматического подхода является то, что обсуждение теоретических вопросов сведено к минимуму, необходимому для понимания лишь основ описываемых новых методов. Тем не менее примеры, приведенные в тексте, и сделанные при этом пояснения позволяют снабдить читателя некоторым багажом теоретических познаний.

Мы стремились охватить большинство основных подходов, применяемых для изучения биологических мембран. В одних случаях экспериментальные методики описаны весьма детально, в других даны обобщенные описания, которые легко приспособить для решения той или иной задачи. Особое внимание уделено тщательному цитированию литературы, с тем чтобы любое, даже мелкое наше упущение читатель смог без особого труда восполнить, обратившись к оригинальной работе. Это особенно важно в такой обширной области, как выделение и характеристика мембран, где разнообразные методы приходится приспосабливать для тех тканей и клеток, которые интересуют исследователя. Отметим, что в настоящее время описаны методы выделения из животных и растительных эукариотических клеток соответственно 10 и 13 гомогенных в биохимическом отношении мембранных систем.

Значительное внимание уделено применению в мембранных исследованиях моноклональных и поликлональных антител. Наиболее интересны методы очистки белков на иммуносорбентах и использование антител при анализе библиотек кДНК; это создает возможности для молекулярного клонирования все большего числа мембранных белков. Методы анализа липидов более рутинны, но даже здесь в последнее время выполнены важные работы; особенно это касается анализа фосфоинозитидов и топологии мембранных липидов. Проблемы фракционирования и анализа мембранных белков, всегда остро стоявшие перед исследователями, потребовали развития новых методических подходов, которые тоже нашли отражение в данной книге. В ней освещается и техника реконструкции мембран — одно из новейших и важнейших направлений на пути углубления наших знаний о функциональной активности и механизмах действия мембранных белков. Мы не включили в этот сборник методы анализа углеводов, поскольку им был посвящен отдельный том данной серии.

Благодаря широкому кругу затронутых проблем эта монография заметно отличается от большинства других книг данной серии. Особенно показательным включение в нее разделов, посвященных биофизическим подходам. Мы понимаем, что невозможно детально рассмотреть каждый из применяемых в этой области методов, зачастую весьма сложных и требующих специальных познаний. Но с другой стороны, нельзя обойти стороной те подходы, которые внесли такой большой вклад в наши знания о структуре и функциях мембран. Мы надеемся, что материал, представленный в гл. 7 и 8, прольет свет на те проблемы, которые трудно изучать другими методами, и воодушевит экспериментаторов на поиск в новых сферах исследования.

Конечно, некоторые вопросы изложены в книге слишком лаконично или остались совсем не затронутыми. Поэтому мы будем признательны за любые замечания по тексту и исправления любых ошибок, как грубых, так и малозначительных, которые, возможно, остались не замечены нами.

Дж. Б. Финдлей, У. Эванз

E. M. Bailyes

Department of Clinical Biochemistry, Addenbrooke's Hospital,
Cambridge University Medical School, Hills Road, Cambridge
CB2 2QR, UK

C. L. Bashford

Department of Biochemistry, St. George's Hospital Medical School,
Cranmer Terrace, London SW17 0RE, UK

A. O. Brightman

University of Purdue Cancer Research Center, West Lafayette,
IN 47907, USA

J. P. Earnest

Department of Biochemistry and Biophysics, University of California,
Davis, CA 95616, USA

W. H. Evans

Medical Research Council, National Institute for Medical Research,
The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, UK

J. B. C. Findlay

Department of Biochemistry, University of Leeds, Leeds LS2 9JT,
UK

J. A. Higgins

Department of Biochemistry, University of Sheffield, Sheffield
S10 2TN, UK

O. T. Jones

Department of Biochemistry and Biophysics, University of California,
Davis, CA 95616, USA

J. P. Luzio

Department of Clinical Biochemistry, Addenbrooke's Hospital,
Cambridge University Medical School, Hills Road, Cambridge
CB2 2QR, UK

M. G. McNamee

Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, Davis, CA 95616, USA

D. J. Morrè

University of Purdue Cancer Research Center, West Lafayette, IN 47907, USA

P. J. Richardson

Department of Clinical Biochemistry, Addenbrooke's Hospital, Cambridge University Medical School, Hills Road, Cambridge CB2 2QR, UK

A. S. Sandelius

Botanical Institute, University of Göteborg, 41319 Göteborg, Sweden

D. Schubert

Max-Planck-Institut für Biophysik, D-6000 Frankfurt am Main 70, Kennedy-Allee 70, FRG

A. Sivaprasadarao

Department of Biochemistry, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK

Список сокращений

АНС	1-анилинонафталин-8-сульфонат
АцХР	ацетилхолиновый рецептор
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВМЧ	внутримембранные частицы
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ДАБ	диаминобензидин
ДДИС	3,5-дийод-4-дiazобензосульфонат
ДМСО	диметилсульфоксид
ДМФХ	димиристоилфосфатидилхолин
ДОФХ	диолеилфосфатидилхолин
ДОХ	дезоксихолат
ДСК	дифференциальная сканирующая калориметрия
ДСН	додецилсульфат натрия
ДТАБ	додецилтриметиламмонийбромид
ДТНБ	дитионитробензоат
ДТТ	дитиотреитол
ДТЭ	дитиоэритреитол
ДФФ	диизопропилфторфосфат
ДЭФХ	диэладоилфосфатидилхолин
ИНТ	2- <i>n</i> -иодофенил-3- <i>n</i> -нитрофенил-5-фенил-2Н-тетразо- лийхлорид
ККМ	критическая концентрация мицеллообразования
НФК	N-1-нафтилфталамовая кислота
НФМ	непрерывный флуоресцентный микрофотолиз
ПВП	поливинилпирролидон
ПОФХ	пальмитоилолеилфосфатидилхолин
ПХ	пероксидаза хрена
ПЭГ	полиэтиленгликоль
СЖХБ	скоростная жидкостная хроматография белков
ТИД	3-триформетил-3- (<i>m</i> -иодофенил) диазирин
ТСХ	тонкослойная хроматография
ТФУ	трифторуксусная кислота
ФХ	фосфатидилхолин
ФМСФ	фенилметилсульфонилфторид
ЦТАБ	цетилтриметиламмонийбромид
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
CHAPS	3-[(3-холамидопропил) -диметиламмоний]-1-пропан- сульфонат (от англ. 3[(3-cholamidopropyl)-dimethyl- ammonio]1-propanesulphonate)
DMEM	среда Игла в модификации Дульбекко
HEPES	N-2-гидроксэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (от англ. N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2- ethanesulphonic acid)

MEM	минимальная среда Игла
MES	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (от англ. 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid)
MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота (от англ. 3-(N-morpholino)propanesulphonic acid)
PBS	солевой раствор, забуференный фосфатом
PIPES	1,4-пиперазинэтансульфоновая кислота (от англ. piperazine-N,N'-bis-2-ethanesulphonic acid)
TES	N-трис(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфоно- вая кислота (от англ. N-tris(hydroxymethyl)methyl- 2-aminoethanesulphonic acid)

ОРГАНЕЛЛЫ И МЕМБРАНЫ ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ

У. Говард Эванс

1. Введение

Мембраны животных клеток либо ограничивают морфологически различные органеллы со строго определенными функциями, либо образуют ретикулярные или везикулярные структуры в цитоплазме. Из животных клеток, имеющих ядро, выделено и биохимически охарактеризовано около 10 типов мембран. К концу 60-х годов были получены и биохимически охарактеризованы все основные мембраны и органеллы; в первую очередь это касалось клеток печени. С помощью морфометрических измерений [1] были установлены их относительные площади и объемы. Тем не менее анализ безъядерных гомогенатов печени с помощью зонального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы показал, что довольно много мембранных белков все еще остаются неидентифицированными. Стало ясно, что аппарат Гольджи неоднороден [2], особенно в транстубулярном направлении [3], а плазматическая мембрана клеток *in situ* [4, 5] и в культуре [6, 7] обладает функциональной мозаичностью. Идентификация окаймленных мембран и исследование сложного разветвленного эндоцитозного компартмента [8] способствовали тому, что удалось функционально охарактеризовать если не все, то большинство клеточных мембран.

В этой главе мы в основном рассмотрим стратегию выделения мембран животных клеток и определение их свойств. Более полную информацию можно найти в специальных монографиях [9] или оригинальных статьях, на которые мы ссылаемся в этой главе. Методы выделения и характеристики мембран и органелл растительных клеток, в принципе аналогичные таковым для клеток животных, изложены в гл. 2.

2. Методы выделения

2.1. Недеструктивные методы

2.1.1. Высвобождение мембранных везикул

Эта группа методик основана на получении фрагментов, отделяющихся от поверхности клетки, как правило в виде везикулярных структур. Клетки, особенно опухолевые [10], спонтанно

высвобождают в среду микровезикулы, происходящие из плазматической мембраны. Например, от лейкозных клеток отделяются везикулы, обогащенные опухолевыми антигенами [11], клетки мастоцитомы высвобождают антигены H-2 [12], от ретикулоцитов отделяются везикулы, содержащие рецепторы трансферрина [13], а от клеток А-431 — везикулы, содержащие рецепторы фактора роста эпидермиса, — киназные комплексы [14]. Отделение микровезикул, обогащенных маркерными компонентами плазматической мембраны, можно индуцировать с помощью разнообразных химических агентов. Так, в монослоях фибробластов и в миобластах происходит отделение везикул от плазматической мембраны при инкубации клеток от 15 мин до 2 ч в безбелковой среде, содержащей 25 мМ формальдегид + 2 мМ дитиотреитол (ДТТ) или 10 мМ N-этилмаленимид [15]. Лимфоциты, инкубируемые в присутствии колхицина или цитохалазина, высвобождают везикулы, содержащие IgM и IgD [16]. При инкубации эритроцитов в среде с ЭДТА—CaCl₂ от них отделяются без гемолiza везикулы, обедненные актином и спектрином [17]; тромбоциты также высвобождают везикулы в присутствии небольшого количества детергента, например дилаурилглицеролфосфохолина (Sigma) [18]. От изолированных гепатоцитов, находящихся в солевой среде, после скоростного центрифугирования отделяются везикулы, происходящие в основном из плазматической мембраны [19]. Мембранные фрагменты могут отделяться не только от изолированных клеток, но и от целых организмов. Например, у шистосом, червей класса трематод, они отделяются от поверхности тегумента; этот процесс ускоряется при механическом воздействии (например, при встряхивании червей) [20].

Чтобы выделить образовавшиеся таким образом везикулы, нужно отделить продуцирующие их клетки или организмы осаждением или центрифугированием при низкой скорости (например, 500 g в течение 2 мин) и собрать супернатант.

2.1.2. Адсорбция на твердых поверхностях

Этот способ быстрого выделения плазматических мембран из клеток позволяет обойтись без фракционирования клетки. Методика в общих чертах описана в табл. 1.1, а иллюстрирует ее рис. 1.1. С помощью этого метода обычно получают мембраны эритроцитов, клеток гепатомы и HeLa [21—24], однако потенциальные возможности метода гораздо шире. Первые опыты с эритроцитами показали, что плазматические мембраны, сорбированные на отрицательно заряженных сферических гранулах и остающиеся на них после отмывания клеток и их обломков, обращены в среду цитоплазматической стороной. Однако необхо-

Таблица 1.1. Выделение мембран с помощью сферических гранул, покрытых полилизин¹⁾

1. Обрабатывают шарики Bio-Gel P-2 полилизин¹⁾ (мол. масса 84—91 кДа, Miles Laboratories) или полиэтиленгликоном (мол. масса 50—100 кДа, Polyscience), как описано в работе [24]. Можно использовать также покрытые полилизин¹⁾ шарики Biorad Cytodex 1 Beads (Pharmacia).
2. Прикрепляют клетки к шарикам. Для этого пять раз промывают шарики (~0,5 мл) десятью объемами 0,15 М трис-буфера, pH 7,4 (осаждают центрифугированием), и четыре раза — раствором, содержащим 0,14 М сорбитол, 20 мМ ацетат, pH 5,0 (буфер 1). Добавляют шарики, суспендированные в 5 мл буфера 1, к равному объему клеток, также суспендированных в буфере 1. Оставляют на 10 мин при 4°C в центрифужной пробирке, аккуратно ее переворачивая, чтобы происходило постоянное перемешивание.
3. Доводят объем содержимого пробирки буфером 1 примерно до 50 мл и ждут, пока шарики оседут; удаляют супернатант. Промывают шарики еще два раза, чтобы удалить неприкрепившиеся клетки.
4. В течение 5—10 с сильно встряхивают пробирку на вортексе, добавляют охлажденный во льду 10 мМ трис-HCl, pH 7,4 (буфер 2), и перемешивают содержимое, переворачивая пробирку. Затем четыре раза промывают шарики буфером 2, чтобы освободиться от клеток. Число прикрепившихся клеток можно оценить с помощью сканирующей электронной микроскопии; если целые клетки все еще остаются на шариках, необходимо промыть их еще несколько раз.
5. После окончательной промывки суспендируют покрытые мембранами шарики в буфере 2 и обрабатывают ультразвуком при 20 Вт (или менее) в течение 5 с. Затем трижды промывают шарики буфером 2. Теперь их можно использовать для биохимического анализа прикрепленных мембран.

¹⁾ Из работы [21]; см. рис. 1.1.

димо иметь в виду, что плазматическая мембрана клеток, содержащих ядро, имеет тенденцию к образованию везикул с правильной ориентацией (невывернутые везикулы). Сорбированные на сферических гранулах мембраны можно подвергнуть прямому ферментативному и химическому анализу; десорбция же мембран возможна только под действием детергентов или при экстремальных значениях pH, а это может привести к нарушению биологической активности.

Помимо гранул, покрытых полилизин¹⁾, используют и другие твердые носители. Например, с помощью гранул сефадекса, обработанных нитроцеллюлозой, получали плазматические мембраны из L-клеток мыши [25], нейлоновые волокна (Baxter-Travenol Labs, Deerfield, 60015, USA) применяли для выделения плазматических мембран перитонеальных лейкоцитов [26], коллоидный силикон — для выделения плазматических мембран *Dictiostelium* [27], сефарозные гранулы, на поверхности которых фиксированы различные лектины, — для получения плазматических мембран эритроцитов [28] и клеток лимфомы мышей [6]. Биологическую специфичность этого метода можно повысить, модифицируя поверхность твердых носителей с помощью антител; иммуноадсорбционный метод выделения клеточных мембран описан в гл. 3.

Таблица 1.2. Методы разрушения клеток в составе тканей

Аппарат	Замечания по использованию
Гомогенизаторы Даунса	Широко применяются. Имеют разный рабочий объем (3—30 мл), плотно притертый (зазор 0,07 мм) или слабо притертый пестик. Движение пестика осуществляется вручную, поэтому возникающие сдвиговые силы невелики. Гомогенизаторы с плотно притертыми пестиками пригодны для гомогенизации культивируемых клеток, набухших в гипотонической среде.
Гомогенизаторы Поттера — Элвехейма	Широко применяются. Имеют разный рабочий объем (5—50 мл). Требуют использования моторов с большим числом оборотов. Выпускаются модели с водяным охлаждением (B. Braun, Melsinger, FRG). Зазор обычно составляет 0,10—0,23 мм, но может быть и больше, если пестик изготовлен из тефлона. Пригодны для гомогенизации тканей, которые сначала необходимо измельчить или нарезать мелкими кусочками с помощью ножниц. Выпускаются аппараты для непрерывной гомогенизации (Yamamoto Scientific Co., Minatoku, Tokyo 105, Japan, and Northbrook, IL 60062, USA).
Polytron, Ultraturrax	Широко применяются. Выпускаются модели с разным размером вала. Возможны затруднения при стандартизации. Измельчение осуществляется вращающимися ножницами; пригодны для гомогенизации волокнистых и мышечных тканей. Для измельчения больших количеств препаратов можно использовать гомогенизатор Уоринга или гомогенизатор, применяющийся для измельчения пищи. Для объемов менее 0,5 мл выпускается аппарат «Tissue-Tearor» фирмой Biospec. Inc., P.O. Box 722, Bartlesville, OK 74005, USA.
«Азотные бомбы»	Позволяют диспергировать клетки за один прием. Отсутствуют тепловые повреждения. Необходима калибровка для минимизации повреждения оргanelл. Величина прикладываемого давления находится в диапазоне от 20 до 100 атмосфер, а время выдерживания под давлением — от 10 до 30 мин. Поставляются фирмами Rapp, Kontes, Braun и Yeda. Применяются также аппараты с мини-камерами (емкость 5—15 мл).
Насосы	Широкого распространения не получили. Электрические или гидравлические, с регулируемым с помощью пружины наконечником. Можно получать хорошие препараты плазматических мембран.
Прессы	Обычно используется продукция Stansted и Locke. Помимо пресса Френча применяют множество модификаций, в которых ткани пропускают под давлением через отверстие или трубочку. Аппараты Biox X-press (AB Biox, Box 143, Jarfalla, Sweden S 17523, Life Science Labs LTD. Sarum Road, Luton, Beds., UK) используют для гомогенизации замороженных тканей. Пресс для измельчения тканей предоставляет фирма Edco Scientific Inc., PO Box 64c, Sherborn, MA 01770, USA.

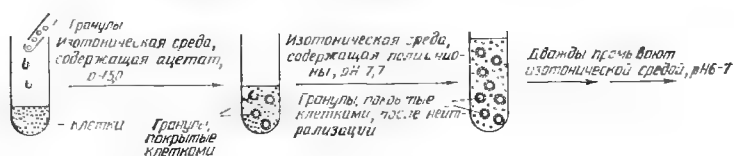
2.2. Методики, включающие разрушение клеток

2.2.1. Разрушение тканей и клеток

Для разрушения тканей разработаны многочисленные методы (табл. 1.2).

1. Изолированные клетки, особенно клетки в культуре, обычно поддаются разрушению труднее, чем клетки *in situ*; из них сложнее получить субклеточные фракции приемлемого качества и с хорошим выходом. Чаще всего для разрушения используют гомогенизатор Даунса малого объема (5—12 мл) с плотно притертым пестиком. Таким способом разрушают клетки, подвергнутые вначале гипотоническому шоку (для этого их инкубируют примерно 10 мин при 4°C в 5 мМ трис-НСl, pH 7,6). Долю разрушенных клеток после гомогенизации определяют с помощью

Адсорбция клеток — нейтрализация клеточных элизов



Разрушение клеток — выделение плазматических мембран

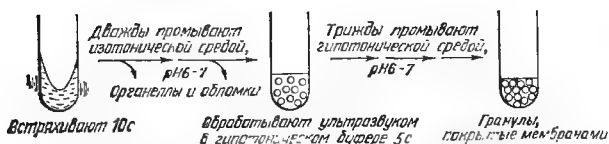


Рис. 1.1. Выделение плазматических мембран с помощью гранул, покрытых поликатионами [24] (подробности см. в табл. 1.1).

фазово-контрастной микроскопии; она должна быть не менее 80%. Клетки, растущие в объемных культурах, разрушаются легче, чем клетки в монослоях, по причинам геометрического характера.

2. Для разрушения клеток в культуре более приемлемы методики, основанные на кавитации газов. Для этого клеточную суспензию заливают в заполненный азотом металлический цилиндр и выдерживают 5—30 мин под высоким давлением (7—65 атмосфер). При быстром понижении давления до уровня атмосферного происходит выделение растворенного в цитоплазме азота, и в результате кавитации при одновременном быстром выведении суспензии через узкий канал клетки разрушаются. В оптимальных условиях, которые надо тщательно подбирать для каждого типа клеток, плазматическая мембрана и эндоплазма-

тический ретикулум образуют маленькие везикулы, а органеллы остаются интактными [30].

3. Еще один метод, не поддающийся стандартизации, — обработка ультразвуком. Этим методом разрушали тучные клетки, причем были подобраны параметры для получения оптимальных результатов (непрерывная или импульсная обработка) [31]. Однако необходимо отметить, что одни популяции тучных клеток разрушаются быстро, тогда как для разрушения других необходима длительная обработка; важна также концентрация Ca^{2+} в среде. Эти положения, по-видимому, справедливы для большинства типов клеток.

4. Многие органеллы и мембранные фракции после выделения подвергаются дальнейшему разрушению для получения субфракций, разделяемых центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Так, при гомогенизации плазматических мембран клеток печени гомогенизатором Даунса с плотно пригнанным пестиком можно получить везикулы желчных канальцев и компоненты, содержащие области мембранных контактов. Эти фракции можно далее разделить по плотности центрифугированием в градиенте сахарозы [32, 33]. При пропускании через пресс Френча при высоком давлении (~ 600 атм) из микросомной фракции скелетных мышц высвобождаются Т-трубочки; они обладают низкой скоростью седиментации и невысокой плотностью, и их очищают в градиенте плотности сахарозы [34].

2.2.2. Среда

Состав среды, в которой разрушают клетки, обычно определяется применяемым методом гомогенизации. Для разрушения тканей используют изотонический раствор сахарозы из расчета 100 мл на 10 г сырого веса ткани; при этом нестрашно, если раствора сахарозы будет немного больше, особенно при центрифугировании в роторе с большим объемом. Гипотоническая среда способствует разрушению клеток, но, если обработка длится слишком долго, при этом может происходить осмотическое разрушение органелл. В присутствии 1—5 мМ MgCl_2 повреждение ядер минимально, но среды с высокими концентрациями солей применять не следует, поскольку они вызывают агрегацию мембран. С другой стороны, везикулы мембран щеточной каемки можно получить из постъядерной фракции гомогената кишечника или почек крысы, используя 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ ЭГТА; при этом происходит избирательное освобождение от других мембран [35, 38].

Поскольку соли Ca^{2+} способны активировать протеазы (см. ниже), их применения следует избегать. В некоторых случаях происходит стабилизация мембран в средах с рН 8,0—9,6, на-

пример, при этом снижается интенсивность образования везикул из плазматической мембраны [36]. В то же время стабильность покрытых клатрином везикул повышается при pH 6,5—6,8. Все это показывает, как сложно делать какие-либо обобщения относительно среды для гомогенизации: каждый мембранный препарат требует индивидуального подхода.

2.2.3. Протеолиз мембран

Проблемы, возникающие при субклеточном фракционировании из-за присутствия в среде протеолитических ферментов, ранее недооценивали. Это стало ясно, когда очищенные мембранные препараты стали использовать как исходный материал для выделения мембранных белков, например рецептора фактора роста эпидермиса [39] и комплекса щелевого контакта [40]. После разрушения клетки высвобождаются многие лизосомные ферменты, ранее изолированные в компартментах, находившиеся в цитозоле или связанные с мембранами. Мембраносвязанные протеазы активируются при длительных препаративных процедурах, особенно в присутствии детергентов. Природа многих из этих протеолитических ферментов нам неизвестна, что усложняет выбор специфических ингибиторов.

В табл. 1.3 приведены примеры протеаз различных классов, указаны свойства соответствующих ингибиторов и даны советы по их применению. Наиболее широко распространенным ингибитором протеаз является, по-видимому, фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ). Время его полуразрушения в водной среде при pH 7 составляет 100 мин, гидролиз происходит быстрее в более щелочных средах и в средах, содержащих фосфат. ФМСФ, хранящийся в этаноле, вводят в среду непосредственно перед употреблением, а потом по мере необходимости добавляют через определенные интервалы времени.

3. Разделение субклеточных компонентов

3.1. Центрифугирование

Методы разделения субклеточных компонентов на основании различий по скорости седиментации (которая определяется весом, размером и формой частиц) и плотности достаточно подробно описаны в литературе [9, 41], а также обсуждаются в гл. 2. Вещество, используемое для приготовления градиента, должно быть легко растворимо в воде, физиологически безвредно и химически инертно; его раствор должен быть невязким, прозрачным в видимой и УФ-областях спектра, а также должен создавать низкое осмотическое давление. Обычно разделение суб-

Таблица 1.3. Ингибиторы протеаз¹⁾

Ингибитор	Ферменты	Обычный диапазон концентраций	Комментарии
Амастатин (также эппамастатин)	Экзоаминопептидазы	1—10 мкг/мл	Очень токсичен
Антипаин	Катепсин В, папаин, трипсин	1—10 мкг/мл	
Бензамидин	Сериновые протеазы	До 10 мМ	
Бензилмалеиновая кислота	Карбоксипептидазы	1—10 мкг/мл	
Бестатин (также эппибестатин)	Экзоаминопептидазы	До 1 мкг/мл	
Химостатин	Катепсин В, химо-трипсин, папаин	1—10 мкг/мл	
Диизопропилфторфосфат (ДФФ)	Сериновые протеазы	До 0,1 мМ	
Дипротин А и В	Дипептидиламинно-пептидазы	10—50 мкг/мл	
Эластатинал	Эластаза	10 мкг/мл	
Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)	Металлопротеазы	0,1—5 мМ	
Леупептин	Катепсин В, папаин, плазмин, трипсин	1—100 мкг/мл	Полезный ингибитор широкого спектра действия
Пепстатин А	Карбоксипро-теазы (пепсин, ренин)	1—10 мкг/мл	
Фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ)	Сериновые протеазы	До 0,1 мМ	Быстро разрушается в водных буферах. Полезный ингибитор широкого спектра действия
Фосфорамидон	Коллагеназа, термолизин	1—10 мкг/мл	Ингибитор Zn-протеаз избирательного действия

Продолжение

Ингибитор	Ферменты	Обычный диапазон концентраций	Комментарии
Тетратрионат натрия	Тиролевые протеазы	До 5 мМ	Из различных источников (белок куриного яйца, соя) и с разной активностью
Тозилметилкетон	Папаин, трипсин		
Тозилфенилаланилхлорметилкетон	Химотрипсин		
Ингибиторы протеаз, типы I—IV	Химотрипсин, трипсин		

¹⁾ Помимо перечисленных следует упомянуть и другие ингибиторы, в частности папаин, меркурибензоат (ПХМБ), йодацетамид и ионы тяжелых металлов (для ингибирования —SH-групп), α_2 -макрглобулин (для ингибирования коллагеназ), апротинин (из легочной ткани) и различные хелатирующие агенты (2-фенаитролин, α - α' -бипиридилфторид натрия). Многие из этих ингибиторов поставляются фирмами Sigma и Boehringer. Апротинин поставляется под торговой маркой Trasylol фирмой Bayer, FRG, и ее филиалами в других странах. Нуперкаин или тетракаин (0,15 мМ) предотвращают гидролиз жиров.

Протеолитические ферменты классифицируют по группам, описанным в работе [37]. Так, в группу сериновых протеаз входят трипсин, химотрипсин, эластаза, катепсин G и активаторы плазминогена, функционирующие при pH 7—9 и подавляемые ДФФ. К тиролевым протеазам относятся различные катепсины, активные при pH 3—8 и подавляемые ПХМБ и йодацетамидом. Карбоксипроотеазы включают катепсин D и пепсин, активные при pH 2—7 и подавляемые пепстатинном. В группу металлопротеаз входят протеазы микроворсинок и коллагеназы, активные при pH 7—9 и подавляемые ЭДТА и дитиотреитолом.

Обычно используемый «коктейль» протеиназных ингибиторов состоит из следующих компонентов. А: пепстатин, 0,5 мг; леупептин, 5,0 мг; химостатин, 5,0 мг; антипаин, 5,0 мг; апротинин, 5,0 мг на 10 мл воды. Эта суспензия используется в разведении 1:100. Все перечисленные реагенты поставляются фирмой Sigma. Б: ФМСФ, 4,3 мг растворяют в 1 мл этанола и используют в концентрации 200 мкл/100 мл. В: 1 мМ ЭДТА, ДФФ и ПХМБ.

клеточных компонентов проводят в градиенте плотности сахарозы. Раствор сахарозы удовлетворяет большинству указанных требований, но при высоких концентрациях он весьма вязок. Это, а также имеющие место осмотические эффекты создают некоторые неудобства (см. Приложение I). Так, в гиперосмотических растворах сахарозы субклеточные везикулы обезвоживаются, а секреторные гранулы подвергаются деструктивному лизису, что ограничивает их пригодность для исследования функций. В растворах с высокой концентрацией сахарозы происходит «разделение» покрытых клатрином везикул. Этот процесс можно частично предотвратить, используя 8%-ный сахарозный градиент, приготовленный на $^1\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$ [42]. Для разделения замкнутых

мембранных везикул и везикул с утечкой [43] с успехом применялись градиенты декстран— H_2O .

Как правило, разделение мембранных фракций в градиенте плотности осуществляется за 3—4 ч или в течение ночи при 80 000 g или выше в роторе с подвесными стаканами (Beckman SW 28 или подобный ему). В некоторых случаях лучше применять вертикальный ротор; это позволяет уменьшить гидростатическое давление и время центрифугирования благодаря уменьшению длины пути. Примером может служить выделение пероксисом [44]. Однако при этом на стенках центрифужных пробирок образуется слоистый осадок, что создает некоторые неудобства.

Разделение с помощью центрифугирования субклеточных компонентов с близкими коэффициентами седиментации и плотностью [в их число входят эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и мембраны эндосом (рис. 1.2)] затруднено; в этом случае приходится привлекать методы (многомерное фракционирование клеток), основанные на других свойствах мембран (например, противоточное разделение) [45, 46].

3.1.1. Новые материалы для приготовления градиентов плотности

1. *Перколл*. Золь силиконовых частиц, покрытых поливинилпирролидоном (Percoll), позволяет уменьшить скорость центрифугирования и создать изотонические условия при выделении клеток и субклеточных частиц. Эти преимущества особенно ценны при получении хрупких органелл и везикул для исследований транспорта. Как правило, для выделения используется перколл, суспендированный в изотоническом растворе сахарозы при нейтральном pH, но в отдельных случаях разделение субклеточных компонентов улучшается при pH 9,0 [36]. Есть множество примеров, когда результаты разделения в перколле были ненамного лучше, чем в градиенте сахарозы.

Присутствие перколла затрудняет определение белка по методу Лоури, но можно применять модифицированный метод с использованием кумаси синего (метод Брэдфорд) (гл. 6). При определении большинства типов ферментативной активности влияние перколла минимально. Коллоидные силиконовые частицы обычно можно удалить дифференциальным центрифугированием или гель-фильтрацией через матрицу с сорбентом Sephadril S-1000 Superfine, как при очистке секреторных гранул из хроматофинной ткани быка [47].

Плотность, при которой происходит уравнивание интересующей нас фракции в перколле, можно определить путем одновременного центрифугирования аналогичных градиентов, содержащих окрашенные маркеры плотности, которые выпускают-

ся фирмой Pharmacia. Кроме того, существует линейная зависимость между плотностью и коэффициентом преломления (см. Приложение I). Примеры применения градиентов перколлы для выделения субклеточных компонентов приведены в табл. 1.5. В табл. 1.4 перечислены случаи использования градиентов перколлы для выделения субклеточных компонентов из различных тканей и клеток.

2. Метризамид (Metrizamide®) и найкоденз (Nycodenz®.)

Применению этих иодированных материалов, изготавливаемых фирмой Nycomed, Oslo 4, Norway и распространяемых в других странах (American distributors 'Accurate Chemical and Scientific Corp', 300 Shames Drive, Westbury, NY 11590, USA), для создания градиентов плотности посвящена другая монография этой серии [74]. Растворы обоих соединений обладают более низкой осмотической активностью и вязкостью, чем растворы сахарозы с близкой плотностью (см. Приложение I). Применение этих реагентов получило самое широкое распространение — начиная от разделения митохондрий, лизосом и пероксисом [75] и кончая выделением секреторных гранул, сохраняющих транспортную активность [76]. Найкоденз обладает некоторыми преимуществами по сравнению с метризамидом. Во-первых, он легче растворяется в растворах сахарозы и солей, что упрощает формирование градиентов. Во-вторых, он не содержит глюкозамина

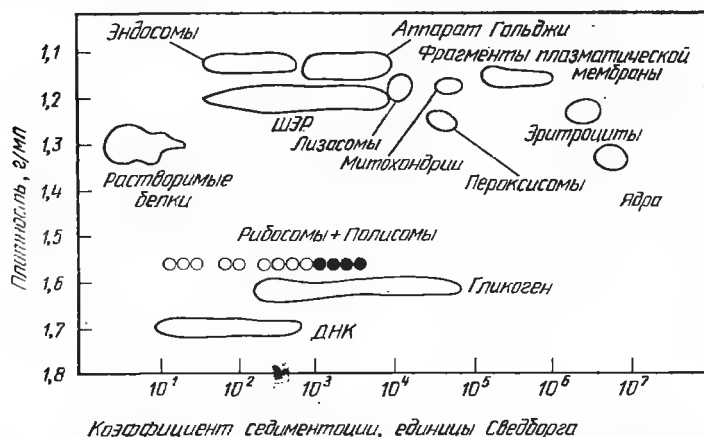


рис. 1.2. Коэффициенты седimentации и плотности различных субклеточных компонентов. Эти компоненты можно разделить, по-разному комбинируя процедуры дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности. Поскольку многие субклеточные компоненты незначительно различаются по массе и плотности, для их выделения применяют другие методики, например разделение в двухфазных системах (разд. 3.2), электрофорез (разд. 3.4) или иммуноаффинную хроматографию (разд. 3.5). Методы модификации плотности компонентов изложены в разд. 3.1.2 (см. также гл. 2).

Таблица 1.4. Примеры использования градиентов перколла¹⁾ для выделения органелл и мембран

Фракция	Источник	Плотность, г/мл	Ссылка
Хромаффинные гранулы	Надпочечники быка	1,067—1,081	[52]
Эндоцитозные везикулы	Клетки К562	1,03	[53]
	Альвеолярные макрофаги кролика	1,05	[49, 50]
Глисосомы Аппарат Гольджи	<i>Trypanosoma brucei</i>	1,087	[54]
	Печень крысы	1,042; 1,057	[55, 56]
		1,028; 1,051	[57]
Лизосомы	Печень крысы	1,087	[55, 58]
	Кортикальный слой почки крысы	1,15	[51]
	Лимфобласты человека	1,085	[59]
Митохондрии	Щитовидная железа свиньи	1,14	[60]
	Печень крысы	1,085—1,100	[61, 62]
	Скелетные мышцы быка	1,035—1,070	[63]
	Печень крысы	1,075	[64]
Пероксисомы Плазматические мембраны	Тромбоциты человека	—	[65]
	Печень крысы, синус	1,02—1,04	[66]
	Аорта крысы	—	[67]
	Клетки асцитной опухоли Кребса	—	[48]
	Кортикальный слой почки кролика, б. л.	1,037	[68]
	Кортикальный слой почки кролика, щ. к.	1,042	[68]
	Нейробластома	—	[69]
	Мозг крысы	1,04—1,05	[70]

¹⁾ Градиент плотности создавали с помощью перколла в 0,25 М сахарозе. В работе [52] применяли 0,27 М раствор сахарозы. В работах [48] и [69] рН среды равнялся 8,8—9,2, а не 7,6. Обозначения: б. л. — базолатеральные плазматические мембраны; щ. к. — щеточная каемка; синус. — синусоидальные домены плазматической мембраны.

и, таким образом, в меньшей степени мешает определению гликозилтрансферазной активности и вообще, как правило, меньше влияет на результаты исследований активности ферментов. Оба реагента имеют высокий коэффициент экстинкции при 280 нм, поэтому для определения содержания белка приходится прибегать к опытам по связыванию с ним красителей; мешают эти вещества и определению нуклеиновых кислот. Найкоденз не осаждается при низких значениях рН и его можно удалить из препарата диализом, ультрафильтрацией или гель-фильтрацией. Он более стабилен и менее дорог, чем метризамид.

Градиенты найкоденза можно создавать *in situ* центрифугированием в угловом или вертикальном роторе, однако лучше все-таки использовать градиенты, сформированные предварительно в 0,25 М растворе сахарозы, рН которого доведен до 7,0—8,0.

Таблица 1.5. Примеры методик быстрого разделения фракций мембран и оргanelл с применением перколла

А. Разделение плазматических мембран и митохондрий из жировых клеток¹⁾

1. Гомогенизируют изолированные жировые клетки (0,5—0,7 г сырого веса) встряхиванием на вортексе в течение 30 с в 2—3 мл 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-НСl, 2 мМ ЭГТА, pH 7,4 (среда А).
2. Центрифугируют при 1000 g в течение 30 с и отсасывают инфранатант и небольшое количество осадка, расположенного под слоем жира. Центрифугируют этот грубый экстракт при 30 000 g 30 мин.
3. Удаляют супернатант и ресуспендируют осадок в 400—500 мкл среды А (с помощью маленького гомогенизатора Даунса). Разводят в 8 мл изотонической суспензии перколла.
4. Готовят изотоническую суспензию перколла, взяв для этого перколл, 2 М сахарозу, 80 мМ трис-НСl, 8 мМ ЭГТА, pH 7,4 (среда Б) и среду А в отношении 7 : 1 : 32 (по объему), чтобы получить плотность 1,05 г/мл. Суспендируют 400 мкл грубой мембранной фракции в 8 мл этой суспензии.
5. Центрифугируют в угловом роторе при 10 000 g 15 мин. Плазматические мембраны концентрируются в верхней части градиента, хорошо отделяясь от митохондрий, которые собираются у дна. Собирают материал с помощью шприца и разводят в пять раз 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭГТА, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl (для плазматических мембран) или 0,25 М сахарозу (для митохондрий).
6. Центрифугируют 25 мин при 10 000 g, чтобы освободиться от гранул перколла.

Б. Выделение эндосом и лизосом из макрофагов²⁾

Аналогичный метод применим для выделения эндосом из клеток в культуре³⁾.

1. Получают альвеолярные макрофаги путем вымывания из легких кролика и суспендируют их в растворе, содержащем 0,25 М сахарозу, 3 мМ имидазол, pH 7,4 (среда А).
2. Гомогенизируют с помощью кавитации азота (разд. 2.2.1). Для этого суспензию выдерживают под давлением 1,73 МПа в течение 10 мин.
3. Центрифугируют при 1000 g 5 мин, собирают супернатант и центрифугируют его при 17 000 об/мин 10 мин (ротор Beckman JA-17).
4. Ресуспендируют осадок в среде А (~2,5 мл).
5. Наслаивают на 30 мл суспензии перколла (плотность 1,07 г/мл) и центрифугируют при 17 000 об/мин в течение часа (ротор Beckman JA-17). Раскапывают градиент на фракции по 1 мл. Интересующий нас интервал плотностей 1,02—1,12 г/мл; эндосомы имеют плотность 1,05 г/мл, а лизосомы — 1,10 г/мл.
6. С помощью дифференциального центрифугирования удаляют перколл.

В. Выделение лизосом из почек⁴⁾

1. Измельчают корковое вещество почки крысы и гомогенизируют четырьмя ходами гомогенизатора Поттера — Элвехейма, пестик которого вращается со скоростью 1000 об/мин (разд. 2.2.1), в 0,3 М сахарозе, 1 мМ ЭДТА; раствор доведен до pH 7,4 трисом (буфер А). На 1 г ткани берется 10 мл раствора.
2. Центрифугируют при 270 g 5 мин, собирают супернатант и центрифугируют его при 3000 g 10 мин (ротор Sorvall SS.34). Удаляют супернатант и рыхлую верхнюю часть осадка и ресуспендируют осадок в большом объеме ($\times 20$) буфера А. Центрифугируют при 500 g по 5 мин дважды, чтобы осадить эритроциты, а затем центрифугируют супернатант при 3000 g 10 мин, чтобы получить грубую лизосомную фракцию.
3. Ресуспендируют осадок в минимальном объеме буфера А (300 мкл/г ткани). Готовят градиент перколла. Для этого берут перколл, 2 М сахарозу

Продолжение

- и 0,1 М 3-(N-морфолин)пропансульфоновую кислоту, pH 7,4, в отношении 75 : 15 : 10 (по объему), всего 14 мл, и центрифугируют при 48 000 g 50 мин (в стеклянных пробирках, ротор SS.34).
4. Наслаивают ресуспендированную грубую фракцию лизосом на градиент перколлы и центрифугируют при 48 000 g 30 мин. Результат разделения показан на рис. 1.3. Собирают фракцию 4, разводят буфером А и центрифугируют при 3000 g 10 мин, чтобы получить лизосомы в супернатанте без перколлы.

¹⁾ По данным работы [71].

²⁾ По данным работ [49, 50].

³⁾ См. работы [72, 73].

⁴⁾ По данным работы [51].

Непрерывные изоосмотические градиенты готовят с помощью двухкамерного смесителя. После разделения фракции собирают, опустив тоненькую трубочку на дно центрифужной пробирки и затем либо отсасывая их, либо вытесняя вверх подслоением тяжелого сахарозного раствора или инертного невязкого раствора максиденза с плотностью 1,9 г/мл, не смешивающегося с водной средой (продукция фирмы Nycomed). Исходные 40%-ные растворы метризамида и найкоденза готовят в 0,25 М сахарозе и при необходимости разбавляют этим же раствором сахарозы. Для получения плотности ниже 1,10 г/мл раствор сахарозы можно заменить водой. Рассмотрим несколько примеров фракционирования в градиентах найкоденза.

1. *Субфракционирование эндоцитозных везикул из печени крысы.* Наслаивают «легкую» микросомную фракцию (полученную так, как указано в табл. 1.12) на непрерывный градиент найкоденза, приготовленный с помощью смесителя из 6 мл 27,6%-ного и 6 мл 13,8%-ного (в/о) растворов найкоденза в 0,25 М сахарозе и воде соответственно. Центрифугируют при 98 000 g в течение 2 ч в роторе с подвесными стаканами (Beckman SW 28), чтобы разделить две содержащие лиганды эндосомные фракции (разд. 5.7) с плотностями 1,090 и 1,115 г/мл [77, 78].

2. *Выделение лизосом или пероксисом.* Создают градиент 19—30% (плотность 1,105—1,16 г/мл). Наслаивают митохондриальную фракцию из печени крысы [75] (см. разд. 5.3 и 5.4, где методика описана полнее) и собирают лизосомы (плотность 1,110—1,135 г/мл) и пероксисомы (плотность 1,21—1,26 г/мл) после центрифугирования при 97 000 g в течение 2 ч.

Плотности образцов в градиентах из иодированных материалов рассчитывают следующим образом. Если η — коэффициент преломления, то плотность (г/мл) при 20°C равна $3,453\eta - 3,601$ для метризамида, $3,287\eta - 3,383$ для найкоденза (с NaCl) и $3,410\eta - 3,555$ для найкоденза (с сахарозой). Раствор сахарозы изоосмотичен (0,25 М), а концентрация NaCl составляет 0,15 М.

Таблица 1.6. Значения плотности, при которых происходит уравнивание субклеточных фракций в градиентах найкоденза или сахарозы

Субклеточная фракция	Плотность, г/мл	
	сахароза	найкоденз ¹⁾
Энтероциты морской свинки		
Митохондрии	1,19—1,21	1,16—1,19
Лизосомы	1,20—1,21	1,14—1,17
Плазматические мембраны	1,14—1,16	1,11—1,15
Эндоплазматический ретикулум	1,10—1,23	1,11—1,18
Печень грызунов		
Ядра	>1,30	1,23
Эндосомы	1,11—1,13	1,09—1,11
Пероксисомы	1,23	1,22

¹⁾ Найкоденз в 0,25 М растворе сахарозы.

Сравнительные данные по плотностям, при которых происходит уравнивание разных субклеточных фракций в градиентах найкоденза и сахарозы, приведены в табл. 1.6.

3.1.2. Изменение плотности разделяемых компонентов

Скорости седиментации и плотность различных субклеточных компонентов довольно близки (рис. 1.2). Это привело к необходимости создания подходов для избирательного их изменения. Все эти подходы можно разделить на две основные категории. К первой относятся методы с применением реагентов, которые избирательно связываются с группами, присутствующими в одних мембранах и отсутствующими в других. Ко второй относится целый спектр методов, с помощью которых внутрь везикул вводят определенные вещества или направленно изменяют содержимое везикул, вследствие чего сильно меняются их седиментационные свойства (скорость седиментации/плотность).

Мембранные модификаторы

Преимущественное связывание дигитонина с холестеролом позволяет увеличить плотность богатых холестеролом мембран без заметной солюбилизации интегральных белков. Оптимальное увеличение плотности плазматических мембран происходит при эквимольном соотношении между дигитонином и холестеролом. Если содержание холестерина во фракциях неизвестно (например, в мембранах из мышц), дигитонин берут из расчета 0,1 мг на 1 мг белка [79]. Обработка дигитонином постядерной фракции лимфоцитов приводит к заметному смещению пиков актив-

ностей 5'-нуклеотидазы, щелочной фосфодиэстеразы и лейцин-аминопептидазы в сторону больших плотностей, тогда как пик активности галактозилтрансферазы сдвигается незначительно (см. Приложение II, где говорится о локализации субклеточных ферментов-маркеров). Напротив, положение пиков маннозилтрансферазы (маркера гладкого эндоплазматического ретикулула), цитохромоксидазы и N-ацетил- β -глюкозаминидазы не изменяется [80].

Используется следующая методика. Определяют содержание холестерина в мембранах (например, с помощью газовой хроматографии липидных экстрактов фракций; гл. 4). Добавляют раствор дигитонина (0,3%) к перемешиваемой субклеточной фракции в таком количестве, чтобы молярное отношение дигитони-

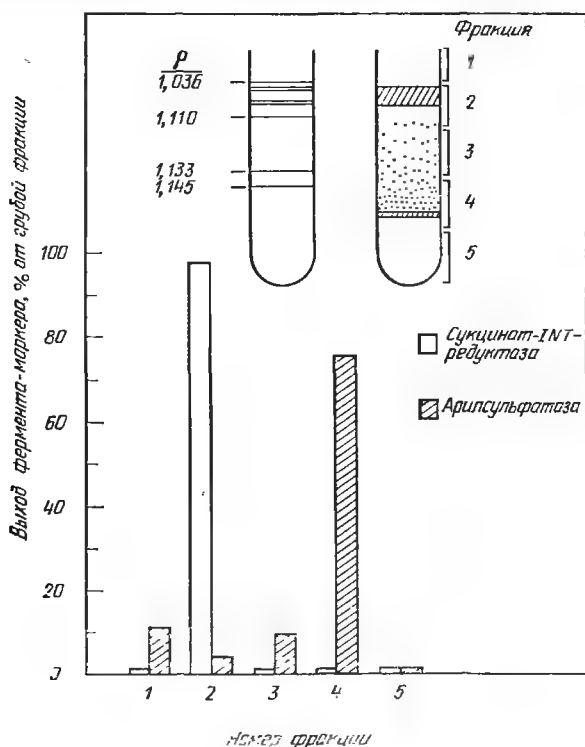


Рис. 1.3. Разделение митохондрий и лизосом из клеток почек в градиенте перколлы [51]. Грубую «митохондриально-лизосомную» фракцию наплавают на градиент перколлы (см. текст). Плотность определяют с помощью специально окрашенных гранул. Фракцию 4 (наиболее мутная полоса) отбирают с помощью шприца, разводят раствором сахара/ЭДТА и центрифугируют при 3000 g 10 мин, чтобы осадить лизосомы (темный осадок). Гранулы перколлы при таких низких скоростях не осаждаются.

на к холестеролу составило 1 : 1. Конечная концентрация дигитонина не должна превышать 0,01 %, иначе может произойти солюбилизация мембранных компонентов и появиться утечка в замкнутых везикулах.

Изменение содержимого везикул

1. *Митохондрии.* При инкубации фракции синапсом мозга после гипотонического шока в растворе, содержащем 1 мМ *п*-иод-нитротетразолий и 80 мМ сукцинат натрия, рН 7,4, в течение 20 мин при 3°C внутри митохондрий образуются кристаллы формазана, в результате чего плотность становится выше, чем у плазматических мембран синапсом. Кроме того, при этом образуются сшивки между постсинаптическими компонентами, происходит их стабилизация, протекают процессы, способствующие их выделению [81]. Обработка гомогената из печени крысы 10 мМ фосфатом калия увеличивает скорость седиментации митохондрий, не влияя на осаждение лизосом, что позволяет очищать последние в градиенте плотности перколла [82].

2. *Т-трубочки.* Хорошо разработана методика, основанная на заполнении везикул оксалатом или фосфатом кальция. Это позволяет отделить везикулы, происходящие из Т-трубочек, от других ретикулярных или сарколемных мембран микросомной фракции из мышц (рис. 1.4). Ca^{2+} -АТРаза проявляет более высокую активность в случае мембран, не являющихся фрагментами Т-трубочек. Это приводит к более интенсивному поглощению Ca^{2+} такими везикулами, накоплению в них фосфата кальция и соответственно к смещению в градиенте плотности сахарозы.

Согласно этой методике [83], мышцы кролика измельчают, гомогенизируют в гомогенизаторе Уоринга в течение 50 с в среде, содержащей 0,2 М сахарозу и 0,02 М трис-малеат, рН 7,0,

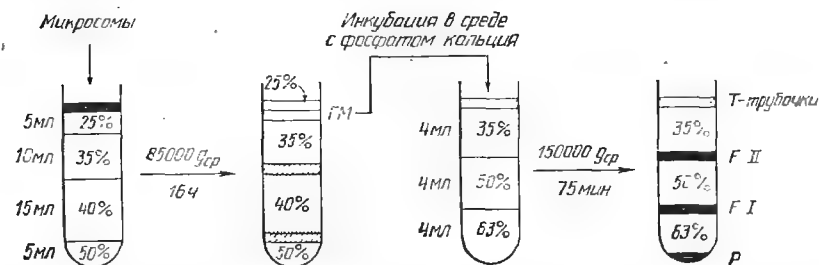


Рис. 1.4. Выделение мембран Т-трубочек из скелетных мышц кролика с помощью модификации плотности [83]. Из скелетных мышц выделяли микросомы, насливали их на градиент плотности сахарозы и полученную фракцию гладких мембран (ГМ) после инкубации в среде, содержащей фосфат кальция (см. текст), вновь насливали на градиент сахарозы. После фракционирования в этом градиенте получали Т-трубочки.

центрифугируют при 3000 *g* 20 мин. Полученный супернатант центрифугируют при 10 000 *g* в течение 20 мин. Конечный супернатант фильтруют через муслиновую ткань и центрифугируют при 100 000 *g* в течение 1 ч, чтобы получить микросомную фракцию.

Инкубируют микросомную фракцию (0,1 мг белка на 1 мл) в течение 20 мин при 22°C в среде, содержащей 5 мМ $MgCl_2$, 0,15 М KCl , 0,3 мМ $CaCl_2$ и 2 мМ АТР, рН 7,4. Наносят фракцию на сахарозный градиент, показанный на рис. 1.4 (ротатор Beckman SW40 Ti или аналогичный). Наиболее легкая фракция обогащена Т-трубочками; везикулы, содержащие фосфат кальция, концентрируются при более высоких плотностях; особенно много их в осадке.

3. *Эндоцитозные и секреторные везикулы.* Равновесные плотности эндоцитозных везикул, мембран аппарата Гольджи и других гладких мембран довольно близки, поэтому были разработаны специальные методы изменения плотности эндоцитозных везикул с использованием специфических лигандов.

Один из методов [84] основан на включении пероксидазы хрена в везикулы исключительно эндоцитозных мембран с последующей инкубацией в среде для цитохимического выявления пероксидазы, что приводит к избирательному увеличению равновесной плотности структур, содержащих этот фермент. Методика сводится к введению в печень галактозилированного бычьего сывороточного альбумина, сшитого с пероксидазой хрена, который локализуется в эндоцитозных везикулах (плотность в сахарозном градиенте 1,11—1,13 г/мл). Для этого готовят раствор галактозилированного сывороточного альбумина, как это описано в работе [85]. Далее перфузируют печень крысы этим раствором, через 10 мин отмывают и фракционируют, как описано в разд. 5.3, чтобы отделить супернатант от осадка «легких митохондрий». Осадок мембранных везикул из этого супернатанта (100 000 *g* в течение 1 ч) ресуспендируют в 0,25 М сахарозе и центрифугируют в 10—60%-ном (в/о) градиенте сахарозы (ротатор Beckman SW-28 или аналогичный) в течение 3 ч при 100 000 *g*. Собирают фракции с плотностью 1,11—1,13 г/мл и инкубируют их 30 мин при 25°C в 5,5 мМ 3,3'-диаминобензидине, 11 мМ H_2O_2 . Вновь центрифугируют в 23—60%-ном (в/о) (1,1—1,3 г/мл) градиенте сахарозы; собирают эндоцитозные везикулы, содержащие лиганд, в диапазоне плотности 1,19—1,23 г/мл. В общем виде методика описана в табл. 1.7. Тонкость ее состоит в том, что обработанная фракция должна быть тщательно отмыта от солюбилизированной или адсорбированной пероксидазы хрена, иначе может произойти агрегация.

Для выделения эндосом из клеток А431 применяется другой подход, основанный на высокой плотности коллоидного золота:

Таблица 1.7. Изменение плотности эндосом для их выделения с помощью ДАБ¹⁾

1. Для эндоцитозного поглощения, опосредованного рецептором, пришивают соответствующий лиганд к пероксидазе хрена (ПХ, RZ-3) и отделяют этот комплекс от свободных лиганда и ПХ.
2. Подбирают условия эндоцитоза так, чтобы сконцентрировать комплекс лиганд—ПХ в интересующем нас эндоцитозном компартменте [варьируют тип лиганда, коинкубенты, время поглощения (обычно 3—10 мин) и т. д.].
3. Как только станет возможно, освобождаются от содержащейся в среде и адсорбированной на мембране ПХ, отмывая клетки или перфузируя ткань холодной солевой средой, содержащей 1 мМ ЭГТА.
4. Выделяют субклеточную фракцию, наиболее обогащенную лигандом, с помощью дифференциального центрифугирования (Получение легкой митохондриальной фракции печени описано в разд. 5.3.) Осторожно ресуспендируют материал, чтобы избежать освобождения ПХ из поврежденных органелл.
5. Очищают содержащие лиганды органеллы первым уравниванием в градиенте плотности сахарозы (10—60%, в/о), забуференном 3 мМ имидазолом/НСl и содержащем метризамид, перколл и т. д. При этом удаляется также свободная ПХ, которая остается в месте нанесения препарата.
6. Инкубируют 15—30 мин при 25 °C в темноте в свежеприготовленном профильтрованном через миллипоровый фильтр растворе, содержащем 5,5 мМ 3,3'-диаминобензидин (Sigma, Grade II) и 11 мМ H₂O₂; вся система должна находиться в среде с плотностью, соответствующей плотности раствора для первого уравнивания органелл. Измеряют необходимые ферментативные активности до и после инкубации.
7. Снова уравнивают образец в градиенте плотности, начиная с плотности, в которой органеллы были уравновешены первый раз (п. 5).
8. Чтобы учесть влияние загрязнений из центрифужной пробирки, инкубируют контрольную пробу в отсутствие H₂O₂.
9. Для установления степени агрегации органелл смесь фракции, обогащенной комплексом лиганд—ПХ, и фракции, полученной из клеток, не обработанных этим комплексом, а меченных другим изотопом, инкубируют в ДАБ и H₂O₂. Метка не должна вытесняться.

¹⁾ Р. Courtoy, личное сообщение. См. также работу [84].

меченные золотом антитела связываются с рецептором трансферрина [86]. Разделение эндоцитозных и окаймленных везикул, содержащих ферменты, можно осуществить в градиенте плотности с помощью реагентов Карновски—Рутса. Эти реагенты избирательно связываются с ацетилхолинэстеразой, в результате чего образуются отложения железа/меди. С помощью этого метода удалось в дальнейшем разделить эндо- и экзоцитозные окаймленные везикулы из перфузированной печени крысы [87, 223].

3.1.3. Компьютерное моделирование субклеточного фракционирования с помощью центрифугирования

Прежде чем приступить к субклеточному фракционированию путем центрифугирования, необходимо выбрать тип ротора (угловой, с подвесными стаканами, вертикальный), время центрифуги-

гирования, объем образца, тип и объем градиента, диапазон плотности и ее профиль и т. д. В настоящее время фирмы, изготавливающие центрифуги, создают программы, которые позволяют промоделировать любое разделение с помощью центрифугирования и таким образом уменьшить число пробных и ошибочных опытов по центрифугированию, а возможно, и вообще избежать их [88]. Программа «Centrisim» (пакет программ фирмы E. I. du Pont de Nemours, CT, USA; Sorvall Equipment) предназначена для компьютеров Apple или IBM, и ее применение может помочь в более полной реализации возможностей центрифуг

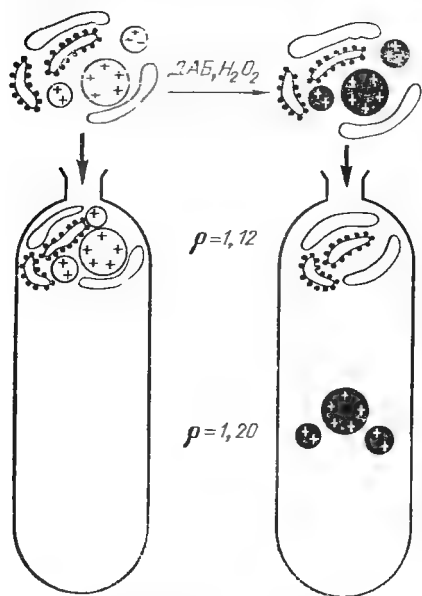


Рис. 1.5. Изменение плотности эндосомных везикул из печени крысы с помощью диаминобензидина (ДАБ) [84]. ДАБ диффундирует внутрь этих везикул, содержащих пероксидазу хрена, сшитую с галактозой/БСА. В присутствии H_2O_2 комплекс пероксидаза—лиганд—ДАБ полимеризуется и остается внутри везикул. Поскольку равновесная плотность полимеризованного ДАБ велика, значительно увеличивается и плавучая плотность эндосомных везикул; это позволяет отделить их от везикул другого происхождения, не содержащих лиганда, например от фрагментов аппарата Гольджи.

для оптимизации изоэнтальных препаративных и аналитических методик разделения. Аналогичная программа разработана также фирмой Beckman. Применение программ для микрокомпьютеров при субклеточном фракционировании с помощью центрифугирования детально обсуждается в другой книге этой серии.

3.2. Разделение в двухфазной системе, содержащей два полимера

Полезным и быстрым способом выделения мембран является разделение их в водной двухфазной системе декстран—полиэтиленгликоль (ПЭГ), особенно если отсутствуют необходимые ультрацентрифуги и роторы [89]. Метод, продуктивность которого

может быть легко повышена, основан на использовании целого ряда свойств мембран, включая электрический заряд, плотность, массу и гидрофобность. Различие в этих свойствах обуславливает разное распределение компонентов смеси между верхней, нижней фазами и поверхностью раздела. По сродству к верхней фазе компоненты животной клетки располагаются в следующем порядке: эндоплазматический ретикулум < митохондрии < лизосомы < аппарат Гольджи < плазматическая мембрана.

Этот метод описан в табл. 1.8 и проиллюстрирован на рис. 2.3. Оптимальное соотношение между степенью очистки препарата и выходом мембран определяется многими факторами. Чистота фракции плазматических мембран, локализующихся в интерфазе, сильно зависит от концентрации солей, осмотичности и pH среды, а также от температуры. Кроме того, поскольку свойства декстрана из разных партий могут различаться, необходимо стандартизовать исходные растворы по оптическому вращению с помощью поляриметра.

Описано применение этого метода для разделения компонентов аппарата Гольджи из почек [92] и печени [93], а также плазматических мембран из желчных канальцев и кровеносных лакун печени [94]. С его помощью можно разделять митохондрии и синапсомы из мозга взрослой крысы: митохондрии локализируются в обогащенной декстраном нижней фазе, а синапсомы — в верхней [95]. Включение в обе фазы детергентов, например N-лаурилсаркозината, позволяет быстро очищать постсинаптические уплотнения (бляшки) из синапсом коры головного мозга животных [96].

Чтобы ускорить серийное разделение и улучшить разрешение метода, были созданы специальные приборы, позволяющие проводить многочисленные экстракции и переносы. Они подразделяются на две категории: приборы, основанные на противоточном распределении и работающие по дискретному принципу переноса Крейга (смешивание—разделение), и приборы для непрерывной проточной хроматографии. В обоих случаях для ускорения разделения фаз можно применять низкоскоростное центрифугирование, особенно когда используются близкие по плотности растворы фикола и декстрана. Методом противоточного разделения было проведено фракционирование гомогената из печени крысы [97].

Успех в применении фазовых систем зависит от адекватности выбора их состава. Качество разделения зависит не только от конкретного полимера (пока число их ограничено — в основном используют декстран и ПЭГ), но и от других параметров: молекулярной массы полимера, концентрации солей, pH, химической модификации полимера. Например, ПЭГ можно модифицировать путем этерификации жирными кислотами [98] или при-

Таблица 1.8. Быстрое выделение плазматических мембран с помощью распределения в двухфазной системе¹⁾

1. Готовят исходные растворы следующим образом.
20%-ый (в/в) декстран²⁾. Наслаивают 220 г декстрана Т-500 на 780 г воды и нагревают, слегка помешивая, до растворения. Доводят концентрацию до 20%, добавляя небольшие порции воды и измеряя оптическое вращение на поляриметре.
30%-ый (в/в) полиэтиленгликоль (ПЭГ) «Carbowax 8000». Берут 300 г ПЭГ на 1 л воды.
Готовят исходные солевые и буферные растворы, в 10 раз более концентрированные, чем используемые в двухфазной системе.
2. Промывают культивируемые клетки (10^6 — 10^8 клеток) и гомогенизируют их любым способом (см. табл. 1.2). Обычно клетки суспендируют в гипотонической среде (например, в 30 мМ NaHCO_3 , pH 7,0) и гомогенизируют в плотно притертом гомогенизаторе Даунса; чтобы разрушить более 80% клеток, может потребоваться до 60 ходов пестика (данные фазово-контрастной микроскопии). Плазматические мембраны можно стабилизировать, добавив в среду ZnCl_2 до концентрации 1 мМ.
3. Центрифугируют при 500—1000 g 15 мин. Ресуспенсируют осадок в верхней фазе, приготовленной, как описано ниже.
4. Смешивают переворачиванием (10—40 раз) 200 г 20%-ного декстрана и 103 г 30%-ного ПЭГ с 33 мл 0,2 М фосфата натрия, pH 6,5, и 179 мл дистиllированной воды. Оставляют при 4 °C на 24 ч и собирают две фазы.
5. Добавляют осадок или грубую мембранную фракцию к 30 мл верхней фазы, полученную суспензию поровиу делят между тремя поликарбонатными пробирками объемом 50 мл. Добавляют в каждую пробирку 10 мл нижней фазы, смешивают и центрифугируют при 2000 g 15 мин в роторе с подвесными стаканами (Sorvall HB-4). Если предполагается проводить разделение в пробирках на 5 мл, объем компонентов может быть пропорционально уменьшен.
6. Собирают мембранный материал с поверхности раздела фаз с помощью шприца. Любые плазматические мембраны, которые еще остаются в супернатанте (п. 3), можно осадить при более высоких скоростях, ресуспендировать осадок и далее использовать методику двухфазного разделения³⁾.
7. Использование различных тканей и клеток может потребовать модификаций способа разрушения клеток и подбора скоростей центрифугирования (см. обсуждение в тексте).

¹⁾ Из работы [90] с изменениями.

²⁾ Мол. масса используемого декстрана [обычно это бывает poly(α -1,6-глюкоза)] может варьировать в широком диапазоне — от 10 000 до 2 000 000; чаще всего используют фракцию Т500 (Pharmacia) с мол. массой 450 000—500 000. Допустимое содержание воды в порошке — 10%. Необходимо запастись достаточным количеством препарата, чтобы его хватило на завершение серии экспериментов, поскольку его свойства могут меняться от партии к партии. ПЭГ производства фирмы Union Carbide Corp. обычно поступает в продажу в виде порошка или хлопьев. ПЭГ 8000 ранее обозначался как ПЭГ 6000. Физические свойства препарата описаны в буклете фирмы Union Carbide.

³⁾ См. работу [91].

шивания лиганда, которые облегчают разделение, основанное на химическом сродстве. Именно таким образом удалось выделить частицы из тканей *Torpedo*, содержащие никотиновые холинэргические рецепторы [99], и получить синапсомы из мозга теленка, обладающие опиатными рецепторами [100].

3.3. Проникающая (адсорбционная) хроматография

С помощью шариков из пористого стекла можно разделять небольшие мембранные везикулы разного диаметра. В качестве примера можно привести разделение синаптических везикул [101] и везикул щеточной каемки кишечника [102] на колонке, заполненной стеклянными шариками со средним диаметром пор 300 нм, предварительно обработанными карбоваксом. Такие шарики выпускаются фирмой Electronucleonics Inc., Fairfield, NJ, USA.

Мембранные или фосфолипидные везикулы можно разделить по размеру и на колонках с сефакирилом S-1000 [103]. В работе [104] описано применение этого метода для определения размеров везикул и разделения окаймленных везикул с использованием жидкостной хроматографии высокого разрешения [104].

3.4. Электрофорез

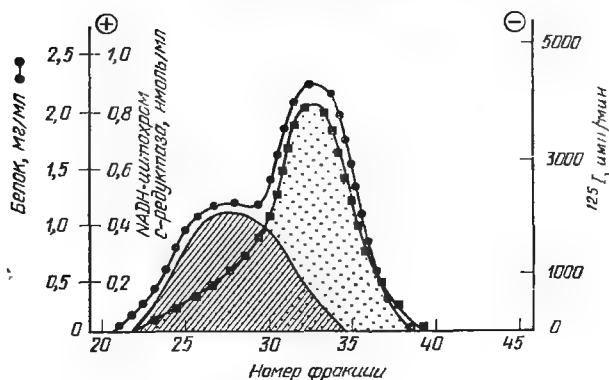
С помощью высоковольтного электрофореза в свободном потоке можно получить препараты субклеточных мембран и органелл высокой степени чистоты [105]. Особенностью последних моделей приборов для электрофореза, например Elphor-VaP. 22, поставляемых фирмой Bender and Hobein (Lindwurmstr. 71, D-8000 Munich 22, FRG) (American distributors Protein Technologies Inc., 1700E, 18th St., Tucson, AZ 85719, USA), является то, что они предназначены для фракционирования субклеточных компонентов, полученных центрифугированием. Подлежащую разделению смесь компонентов подают тонкой струйкой в разделяющий буфер, который движется в электрическом поле; мембраны, несущие разный электрический заряд, перемещаются в разделяющей ячейке со скоростью, определяемой их зарядом, при этом достигается 100%-ное разрешение (рис. 2.4). Это мягкий способ выделения мембран с высоким препаративным выходом.

Методику электрофореза в свободном потоке впервые применили для выделения лизосом из печени крысы и затем использовали для получения субфракций плазматических мембран из лимфоцитов [106] и лейкоцитов [107], лизосом и митохондрий из печени крысы [108], лизосом из клеток в культуре [109], а также для разделения правильно ориентированных и вывернутых эритроцитарных везикул [110]. В настоящее время этот метод пытаются приспособить для разделения компонентов аппарата Гольджи [111] и эндоцитозного компартмента [78] из печени крысы — объектов, для которых применение других методов затруднено.

Рис. 1.6 иллюстрирует применение этой методики для разделения поверхностных и внутренних мембран тромбоцитов. Тром-

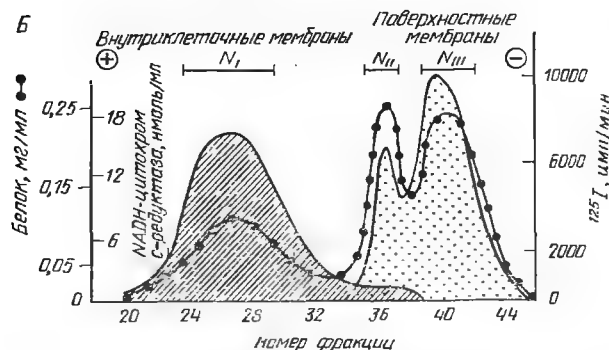
А

Без обработки нейраминидазой



Обработка нейраминидазой

Б



В

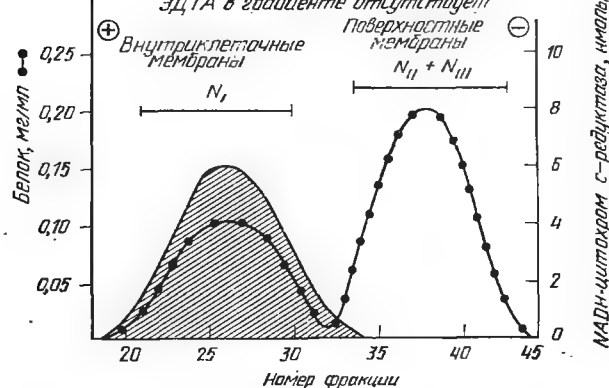
Обработка нейраминидазой
ЭДТА в градиенте отсутствует

Рис. 1.6. Разделение поверхностных и внутриклеточных мембран тромбоцитов с помощью электрофореза в свободном потоке [112]. Рисунок иллюстрирует повышение качества разделения после обработки мембран нейраминидазой и включения ЭДТА в состав градиента плотности сорбитола, в котором проводят фракционирование (подробности см. в тексте).

боциты, разрушенные ультразвуком, фракционировали в линейном (1—3,5 М) градиенте плотности сорбитола, и полученные смешанные препараты мембран разделяли с помощью электрофореза в свободном потоке [112]. Из рисунка видно, насколько важна предварительная обработка клеток нейраминидазой: качество разделения повышается настолько, что появляется возможность охарактеризовать очищенные мембранные фракции по их ферментативной активности.

Методика электрофореза в свободном потоке слишком сложна технически, и мы не можем описать ее здесь достаточно полно. Отметим лишь некоторые практические моменты.

1. Для повышения воспроизводимости результатов и предотвращения агрегации необходимо тщательно обработать наносимый препарат, а именно — освободить его от катионов.

2. Как видно из рис. 1.6, предварительная обработка препарата с помощью ЭДТА способствует дальнейшему фракционированию поверхностных мембран тромбоцитов.

3. Обработка препарата трипсином в низкой концентрации (0,5 мкг/мл) тоже может способствовать разделению частиц, например эндосом и лизосом.

4. Разрешение улучшается при повышении напряжения — если, конечно, осуществляется необходимый контроль за температурой и электрическими параметрами системы (это возможно в последних моделях аппаратов).

Аппараты для электрофореза в свободном потоке довольно дороги, поэтому были разработаны альтернативные электрофоретические методы. Например, электрофорез в агарозных гелях (концентрация 0,15—0,3%), используемый в основном при аналитических исследованиях, применяется и в препаративных целях, особенно при разделении мелких окаймленных везикул и везикул с гладкой поверхностью [113]. Применение этого метода в качестве препаративного ограничивается в основном сложностью элюции частиц с геля; правда, для этого можно использовать устройство для непрерывной элюции с откачиванием из накопительного резервуара [114, 115] (рис. 1.7).

3.5. Иммуноаффинные методы

Эта группа методов отличается от всех описанных ранее тем, что в их основе лежат различия не в физических, а в биологических свойствах разделяемых компонентов. Иммуноаффинные методы обладают рядом преимуществ: их можно применять для разделения малых количеств материала, разделение осуществляется быстро и с высоким выходом. Очень важна ориентация везикул: удается выделить плазматические мембраны, у которых ориентация соответствует таковой в целой клетке.

Подробное описание методов и состояния дел в этой области можно найти в гл. 3.

4. Идентификация и оценка чистоты субклеточных фракций

4.1. Определение ферментов-маркеров

Вся практика субклеточного фракционирования основывается на предпосылке, что каждая органелла или сеть мембран

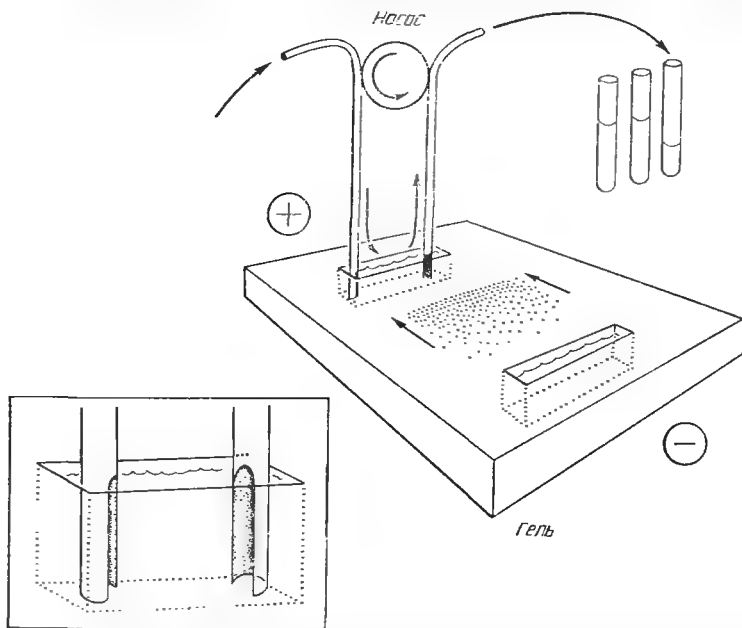


Рис. 1.7. Аппарат для электрофореза в агарозном геле, позволяющий увеличить выход маленьких органелл и частиц. Этот аппарат является модификацией стандартного аппарата для горизонтального электрофореза. Насосное устройство позволяет собирать компоненты по мере их поступления в накопительный резервуар. Внизу слева показан и накопительный резервуар крупным планом; внутренняя сторона трубок срезана, чтобы обеспечить прямой проток буфера через резервуар перпендикулярно направлению движения частиц при электрофорезе. Этим методом разделяют и собирают окаймленные везикулы (см. текст). Используемый буфер имеет следующий состав: 0,02 М 4-морфолиноэтансульфоновая кислота (МЭС), 0,03 М фосфат, 0,25 М сахараза, pH в диапазоне 6,5—7,8. Концентрацию агарозы варьируют от 0,15 до 0,2%. Наносимые образцы должны содержать в основном везикулы малого диаметра, суспендированные в небольшом объеме буфера МЭС, содержащего 6% сахаразы и 6% фикоλλα-70 (Sigma). При напряженности электрического поля на геле 1,0 В/см (толщина слоя агарозы 1 см) скорость потока составляет 12 мл/ч. Подробности см. в работах [114, 115].

содержит такие компоненты или обладает такими свойствами, которые обеспечивают их уникальность [116]. Действительно, ферменты-маркеры, как было предсказано де Дювом, локализуются преимущественно в конкретных органеллах и впоследствии неизменно обнаруживаются в тех мембранах, с которыми они были ассоциированы. Необходимым условием исследований (особенно аналитических) гомогенатов тканей является регистрация активности целого спектра маркеров, что позволяет составить таблицу распределения активностей. Эта таблица дает возможность оценить распределение и активность субклеточных маркеров, обогащение ими по сравнению с гомогенатом и степень загрязнения другими клеточными компонентами (см. также гл. 2). Маркерами преимущественно служат ферменты; в отдельных случаях данные, полученные на основании определения их активности, подкрепляются с помощью химических маркеров; применяют также радиоактивно меченные маркеры (в основном для плазматической мембраны). Морфологический контроль чистоты фракций осуществляется, как правило, на качественном уровне. Методы, позволяющие количественно оценить состав субклеточных фракций на основании их морфологии, рассмотрены в гл. 2.

Конструктивность данного подхода иллюстрируется тем, что с его помощью были выделены основные органеллы и мембраны из многих животных клеток (см. табл. 1.13), однако метод имеет и свои недостатки. Так, установлено, что хотя большинство маркеров имеет наибольшую концентрацию в одном из клеточных компартментов, они могут присутствовать (правда, в меньшем количестве) и в других компартментах. Кроме того, существует последовательность этапов обновления мембран — процесса, в ходе которого белки и липиды перемещаются от места синтеза к месту функционирования и затем в компартмент, где происходит их деградация. Гетерогенность мембран может быть обусловлена и компартментацией сложных органелл, например аппарата Гольджи и плазматической мембраны, с образованием мембранных доменов. Об этом свидетельствуют результаты аналитического центрифугирования гомогенатов тканей [117].

4.2. Выбор маркеров и критерии их использования

В Приложении II приведены данные о первичной субклеточной локализации стандартных ферментов-маркеров. Применимость каждого из этих маркеров варьирует в зависимости от типа клеток. В качестве примера можно привести глюкозо-6-фосфатазу, которая является маркером клеток, осуществляющих глюконеогенез. Организация плазматической мембраны

тканевых клеток в функциональные домены с различными биохимическими свойствами может привести к появлению маркера в более чем одной зоне градиента плотности; это связано с дифференцированной локализацией ферментов в плоскости мембраны и обособлением ее участков в зоне тесного контакта с эпителием. Так, фрагменты плазматической мембраны, происходящие из области микроворсинок, в растворе сахарозы имеют плотность 1,12—1,14 г/мл, а фрагменты, происходящие из латеральной области, содержащей зоны контакта, —1,16—1,18 г/мл [4]. Потеря наружной митохондриальной мембраны во время субклеточного фракционирования может повлечь за собой появление, помимо интактных митохондрий с плотностью 1,19—1,21 г/мл, мембранных везикул с плотностью 1,12—1,14 г/мл.

4.2.1. Ферментные маркеры

К маркерам этого типа относятся обычно сравнительно стабильные ферменты, активность которых достаточно высока и ее удобно измерять. Обычно эти измерения проводят как можно быстрее после выделения; образец при этом хранят при 4°C и не замораживают. Галактозилтрансферазную активность мембран аппарата Гольджи необходимо измерять в свежевыделенных субклеточных фракциях. Отмечено, что даже такие ферменты, как глюкозо-6-фосфатаза и NADPH:цитохром *c* — редуктаза, могут оказаться лабильными и терять активность в замороженных препаратах мембран из печени [118]. Для правильной оценки распределения фермента-маркера весьма существенным является пространственное расположение субстратсвязывающего сайта в замкнутых везикулах, а вопрос о латентности ферментативной активности можно решить, оценив активность в присутствии и в отсутствие 0,1%-ного дезоксихолата или тритона X-100. Методы определения ориентации мембран везикул и наличия утечек описаны в гл. 4.

4.2.2. Химические маркеры

С помощью этих маркеров обычно подкрепляют данные, полученные с использованием ферментных маркеров, однако работа со многими из них достаточно трудоемка. Сигловая кислота и холестерол локализуются преимущественно в плазматической мембране, но обнаруживаются также в эндоцитозных мембранах [78, 119]. Кардиолипид находится исключительно во внутренних мембранах митохондрий, а клатрин, белок с мол. массой 180 кДа, — в окаймленных мембранах (окаймленных везикулах). Удобным маркером часто оказывается содержимое

секреторных гранул, когда субклеточные фракции анализируют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Таким маркером является, например, альбумин в секреторных везикулах аппарата Гольджи из печени.

5. Выделение различных органелл и мембранных систем

Подход к выделению субклеточных мембран, описанный выше в общих чертах, мы теперь конкретизируем применительно к разным органеллам и мембранным системам. Конечно, существуют схемы фракционирования, где из одного тканевого гомогената получают разные мембраны и органеллы. Так, гомогенат печени крысы является источником плазматических мембран, эндоплазматического ретикулума и мембран аппарата Гольджи [120], энтероциты кролика — источником щеточной каемки, базолатеральных плазматических мембран, гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума и мембран аппарата Гольджи [121]. Однако при таких схемах выделения, как правило, приходится принимать компромиссные решения относительно достижимой чистоты фракций. Поэтому в основном для получения желаемых фракций необходимо выбирать специфические среды, способы гомогенизации и разделения.

5.1. Ядра и ядерные мембраны

Ядра — это крупные хрупкие органеллы, состоящие из ядерной оболочки, хроматина, ядрышка и различных гранул. Разработаны приемы, помогающие минимизировать разрушение ядер и последующее высвобождение хроматина, который во время субклеточного фракционирования прикрепляется к другим компонентам, особенно к плазматической мембране. Для диспергирования тканей используют гомогенизаторы с большим зазором (0,12—0,16 мм) и среды, содержащие 0,32 М сахарозу и 1 мМ $MgCl_2$. Полноценные в функциональном отношении интактные ядра получают в среде, содержащей глицерол (50%, в/в); в то же время применение перколла и иодированных материалов при приготовлении градиентов не нашло широкого распространения, поскольку эти агенты проникают внутрь выделенных ядер.

Ядерная оболочка состоит из двух мембран толщиной 7,5—10 нм; наружная мембрана усеяна рибосомами. При выделении эта структура может подвергаться интенсивному протеолизу. Однако если экстракцию проводить при высокой ионной силе [122] (табл. 1.9), то удастся получить хорошо сохранившиеся (если судить по морфологии) ядерные оболочки, лишь слабо загрязненные гистонами и ДНК. Факторы, влияющие на вос-

Таблица 1.9. Выделение ядерных оболочек из печени крысы¹⁾

1. Извлекают печень из нескольких крыс. Отмывают раствором, содержащим 0,25 М сахарозу, 50 мМ трис-НСl, рН 7,4, 5 мМ MgSO₄ (буфер 1), измельчают и гомогенизируют в гомогенизаторе Даунса (слабо притертом). Фильтруют через муслиновую ткань и центрифугируют при 800 g 10 мин.
2. Дважды промывают осадок, ресуспендируя и центрифугируя, как описано в п. 1.
3. Ресуспендируют осадок в буфере, содержащем 2,1 М сахарозу, 50 мМ трис-НСl, рН 7,4, 5 мМ MgSO₄ (буфер 2), и накладывают на подложку из такой же забуференной сахарозы. Центрифугируют при 70 000 g 60 мин (ротор Бектэл SW 27 или аналогичный) и собирают осадок. Еще раз повторяют эту процедуру, чтобы получить ядра, используя гомогенизатор Даунса для ресуспендирования осадка.
4. Ресуспендируют ядра и доводят до концентрации 5·10⁸/мл в буфере 1, куда добавляют ФМСФ до концентрации 1 мМ, и инкубируют с ДНКазой I (250 мкг/мл) и прогретой РНКазой А 60 мин. Центрифугируют при 800 g 10 мин и собирают осадок.
5. Ресуспендируют ядра и доводят до упомянутой выше концентрации в растворе, содержащем 0,2 мМ MgSO₄, 10 мМ трис-НСl, рН 7,4, 1 мМ ФМСФ (буфер 3), и сразу же добавляют 2 М NaCl, растворенный в буфере 3, до концентрации 1,6 М. Осторожно помешивая, добавляют β-меркаптоэтанол до конечной концентрации 1%. Выдерживают 15 мин и центрифугируют при 1600 g 30 мин.
6. Снова экстрагируют осадок буфером 3 и NaCl, как описано в п. 5, но без добавления восстанавливающего агента. Центрифугируют при 1600 g 30 мин, чтобы получить фракцию ядерных оболочек, содержащую в основном единообразные пустые, как правило, сферические структуры.

¹⁾ Из работы [122].

производительность результатов и способы контроля протеолитической деградации при выделении, описаны в работе [123].

Ядерные оболочки не несут никаких других специфических маркеров, кроме нуклеозидтрифосфатаз; некоторые из них стимулируются poly(A⁺)мРНК [124], а также специфическими полипептидами [122]. Такой морфологический маркер, как ядерный поровый комплекс, биохимически пока не охарактеризован. Очевидная непрерывность наружной ядерной мембраны и эндоплазматического ретикулума обуславливает и общность их ферментного состава; в качестве примера можно привести глюкозо-6-фосфатазу.

5.2. Митохондрии

Митохондрии выделяют из многочисленных источников стандартными методами [125]. Субфракционирование их для получения внутренних и наружных мембран и компонентов матрикса проводят после замораживания — оттаивания препарата и или обработки ультразвуком [126]. При обработке ультразвуком стандартного осадка митохондрий, суспендированных в среде.

содержащей 1,2 М сахарозу и 2 мМ АТФ (10 мг мембранного белка на 1 мл), происходит разрушение митохондрий, а после центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы наружные мембраны концентрируются в полосе 0,45—1,12 М сахарозы, внутренние мембраны и компоненты матрикса собираются в осадке, под нижним слоем с концентрацией сахарозы 1,2 М, а промежуточная везикулярная фракция — между двумя предыдущими, в полосе 1,12—1,20 М [126]. Маркерами внутренних митохондриальных мембран служат ферменты — переносчики электронов (Приложение II). Наружная митохондриальная мембрана, которая при фрагментации образует везикулы, сходные по плотности и морфологии с везикулами из плазматических мембран, содержит моноаминоксидазу. Описан также «микро»-метод выделения наружных митохондриальных мембран из печени крысы [127].

5.3. Лизосомы

Лизосомы — это органеллы, участвующие в протеолизе и содержащие до 50 гидролитических ферментов, активных при низких значениях pH. В число этих ферментов входят различные фосфатазы, нуклеазы, гликозидазы, протеазы, пептидазы, сульфатазы и липазы [116].

Все методы выделения лизосом направлены на минимизацию перекрестного загрязнения митохондриями и пероксисомами. Мы уже приводили примеры разделения лизосом и других органелл: разделение в градиенте перколла (разд. 3.1.1), путем изменения плотности органелл (разд. 3.1.2) и с помощью электрофореза в свободном потоке (разд. 3.4). Разработаны и другие методы. Это выделение с использованием комплекса железо — сорбитол — лимонная кислота (AB Astra, Sweden) и коллоидного золота (средний диаметр 25 нм), инъецируемых внутримышечно; эти реагенты накапливаются в лизосомах печени, увеличивая их плавучую плотность [128]. Можно увеличить плотность лизосом и более прямым способом, добавляя в среду для гомогенизации фосфат натрия до концентрации 10 мМ [129].

Однако более широкое распространение нашли способы очистки лизосом и пероксисом с использованием веществ для получения изоосмотических градиентов, особенно метризида и найкодиза (см. ниже). Рассмотрим вкратце, как получают легкую митохондриальную фракцию.

1. Гомогенизируют печень крысы, используя гомогенизатор Поттера — Элвехейма (1000 об/мин, ~5 циклов), при соотношении 1 г ткани на 3 объема 0,25 М раствора сахарозы и центрифугируют гомогенат при 1000 g в течение 10 мин в роторе Sorvall SS-34 или аналогичном ему.

2. Собирают супернатант и суспендируют осадок в трех объемах 0,25 М сахарозы. Центрифугируют при 1000 g в течение 10 мин и объединяют этот супернатант с предыдущим.

3. Центрифугируют объединенный супернатант при 3000 g в течение 10 мин, затем образовавшийся супернатант центрифугируют при 10 000 g в течение 20 мин, чтобы получить «легкую митохондриальную» фракцию. Эта грубая фракция обогащена лизосомами и митохондриями, но содержит также мембраны аппарата Гольджи, пероксисомы и фрагменты эндоплазматического ретикулума.

4. Ресуспенсируют этот осадок (с помощью гомогенизатора Даунса) в 45%-ном (1,25 г/мл) изотоническом растворе метризамида, чтобы получить плотность 1,18 г/мл (детальный расчет плотности представлен в разд. 3.1) и объем примерно 10 мл.

5. Наслаивают сверху (каждый слой по 6 мл) растворы метризамида 30, 26, 24 и 19% (1,16, 1,145, 1,135 и 1,105 г/мл) и центрифугируют в течение 2 ч при 97 000 g (ротор Beckman SW28 или аналогичный). Лизосомы концентрируются в слое с плотностью 1,105—1,135 г/мл [75].

Выход мембран 0,5—1,0 мг белка на 1 г сырого веса печени считается удовлетворительным. Как и при выделении лизосом из почек с помощью градиента перколла (разд. 3.1), удельная активность лизосомных ферментов-маркеров увеличивается в 60—80 раз по отношению к гомогенату. Лизосомные ферменты обнаруживают структурнозависимую латентность, а ферментативная активность полностью проявляется только после разрушения мембран (обычно при суспендировании их в 0,1%-ном растворе тритона X-100).

Лизосомы были выделены также из аорты кроликов с атероматозом и из культивируемых клеток [109]. От животных, которым вводился леупептин, хлороквин или винбластин, получены аутофагические вакуоли — большие вакуоли, захватившие митохондрии, секреторные гранулы и т. д. Методики их выделения близки к методикам, применяемым для получения лизосом; в частности, здесь тоже проводится фракционирование «легкой митохондриальной» фракции в градиентах метризамида [131] или перколла [132]. Полученные фракции обладают характерной морфологией и обогащены лизосомными ферментами-маркерами, но в меньшей степени, чем очищенные фракции лизосом.

5.4. Пероксисомы

Пероксисомы были определены как органеллы, содержащие каталазу и один или более ферментов, продуцирующих H_2O_2 [133]. К настоящему времени исследованы в основном перокси-

сомы из печени грызунов, где их количество можно увеличить до девяти раз, вводя в рацион животных гипополипидемические средства, такие, как клофибрат. Есть сообщения о способах выделения пероксисом из почек и тонкого кишечника [134], из легких [135] и сердца [136].

Стратегия выделения пероксисом из печени включает субфракционирование «легкой митохондриальной» фракции (см. метод получения в разд. 5.3) в градиентах метризамида или найкодиза; в этих методиках используются изоосмотические условия и пониженное гидростатическое давление, что очень важно при выделении хрупких органелл. Пероксисомы достаточно хорошо отделяются от лизосом и митохондрий, когда «легкую митохондриальную» фракцию центрифугируют в 20—50%-ном (в/о) градиенте метризамида; пероксисомы осаждаются в полосе с плотностью 1,220—1,245 г/мл, а лизосомы — при плотности 1,120 г/мл. Фракции загрязнены в основном везикулами эндоплазматического ретикулума (маркер глюкозо-6-фосфатаза). Удельная активность после очистки по сравнению с активностью тканевого гомогената увеличивается в 36—40 раз для каталазы, оксидазы α -гидроксикислот и ферментов β -окисления [137]. Исследован полипептидный и фосфолипидный состав пероксисом печени крысы [138]. При выделении пероксисом использовали также градиенты перколла [64], однако уровень загрязнения митохондриями был при этом выше. Стабильность пероксисом в процессе выделения повышается при обработке постъядерных супернатантов 1 мМ глутаральдегидом в 0,5 мМ какодилате, pH 7,4, предварительно профильтрованном через древесный уголь [139].

5.5. Аппарат Гольджи

Аппарат Гольджи, вначале идентифицированный как морфологически целостное образование, состоящее из стопок цистерн, выделяют в основном из клеток печени, хотя известно, что он присутствует во всех неделящихся клетках секреторных тканей. Эта структура участвует в терминальном гликозилировании, включении сульфатных групп в белки и липиды, процессинге гликопротеинов, образовании рецепторов маннозо-6-фосфатных групп. Этим определяется морфологическая сложность аппарата Гольджи, что в свою очередь стимулирует попытки его субфракционирования.

Существуют разные методы быстрого получения мембран аппарата Гольджи из печени крысы [140, 141], при которых мембраны из постъядерного супернатанта очищают в градиенте сахарозы или перколла [55], где они концентрируются при низкой плотности (табл. 1.10).

Таблица 1.10. Быстрое получение мембран аппарата Гольджи из печени крысы¹⁾ и разделение мембран и растворимого содержимого цистерн

1. Гомогенизируют каждую печень крысы в 26 мл раствора, содержащего 0,5 М сахарозу, 1%-ный декстран (Sigma, средняя мол. масса 252 000), 38 мМ трис-малеат, pH 5,4, в течение 60 с при 8000 об/мин в гомогенизаторе Polytron (см. табл. 1.2; можно использовать также гомогенизаторы Поттера—Элвехейма/Даунса).
2. Центрифугируют гомогенат при 6000 g 15 мин (ротоп Sorvall SS-34 или аналогичный), собирают верхнюю желтовато-коричневую часть осадка и ресуспендируют ее в 5—6 мл супернатанта.
3. Наслаивают порции по 1 мл на 7,5 мл 1,2 М сахарозы (приготовленной на 38 мМ трис-малеате, pH 6,4) в узкие пробирки для бакет-ротора (Beckman SW 28) объемом 13 мл; сверху наслаивают дистиллированную воду. Центрифугируют при 97 000 g 30 мин и собирают грубую фракцию аппарата Гольджи на границе раздела 1,2 М сахароза/нанесенная фракция. Собирают мембраны с помощью шприца и осаждают центрифугированием при 6000 g 20 мин.
4. Чтобы отделить мембраны аппарата Гольджи от содержимого цистерн, ресуспендируют фракцию примерно в 5 мл 100 мМ Na₂CO₃, pH 11,0, и оставляют при 4 °C на 30 мин. Концентрация белка должна быть 0,02—1 мг/мл. Для экстракции пригоден маленький плотно притертый гомогенизатор Даунса. Центрифугируют при 100 000 g 1 ч (ротоп Beckman 50 Ti или аналогичный) и ресуспендируют осадок в 10 мМ трис-HCl, pH 7,4.
5. Такой способ освобождения от содержимого цистерн пригоден также для микросомной фракции, пероксисом и т. д. Аналогично можно удалить рибосомы с шероховатого эндоплазматического ретикулама²⁾. В результате описанной процедуры замкнутые везикулы превращаются в плоские листки, однако интегральные мембранные белки сохраняются. Добавление в щелочную среду ФМСФ до концентрации 1 мМ (табл. 1.3) помогает подавить протеолиз, который может протекать в этих условиях. Необходимо отметить, что в процессе щелочной экстракции многие типы ферментативной активности могут ингибироваться. Альтернативная методика отделения интегральных мембран от растворимых и периферических белков использует распределение в двухфазной системе с тритоном X-114 (Sigma); подробности см. в гл. 6.

¹⁾ Из работы [140].

²⁾ См. работу [142].

Предприняты только первые попытки субфракционировать аппарат Гольджи, особенно вдоль направления его функциональной полярности, чтобы охарактеризовать последовательность распределения ферментов. Достаточно широко используется метод выделения аппарата Гольджи без предварительной нагрузки тканей животных этанолом [141]. В этом случае можно разделить «легкую» фракцию, обогащенную секреторными капелками, и «тяжелую», содержащую элементы типа цистерн. В последнюю входят компоненты, расположенные с *цис*-стороны аппарата Гольджи. Аналогичным образом с помощью градиента перколла можно выделить две мембранные фракции [57], которые содержат сходные количества галактозил- и сиалилтрансфераз, а 1,2,маннозидаза, маннозидаза II и β -N-ацетилглюкоз-

аминилфосфотрансфераза распределены в них неодинаково. Иммунохимические исследования показали, что галактозил- и сиалилтрансферазы локализованы в основном на *транс*-стороне аппарата Гольджи. Для *цис*-стороны маркеры пока не найдены. Эти ферменты локализованы на люминальной стороне мембран. Большие надежды возлагаются на разрабатываемую методику фракционирования мембран аппарата Гольджи из печени крысы с помощью электрофореза в свободном потоке (разд. 3.4); перед нанесением образца на гель для электрофореза его обрабатывают амилазами, а затем подвергают мягкой механической обработке, чтобы разошлись стопки мембран [111].

Фракции аппарата Гольджи, полученные этими методами из печени, гетерогенны. Они загрязнены материалом, предназначенным для секреции и заключенным внутри цистерн и везикул. Для освобождения от растворимых секреторных продуктов необходимо очистить мембранные фракции, суспендированные в 0,1 М Na_2CO_3 , pH 11,0, центрифугированием согласно методике, представленной в табл. 1.10 [142, 143]. «Тяжелые» фракции аппарата Гольджи загрязнены фрагментами плазматических мембран, а «легкие» — в значительной степени мембранами эндосом [56]. Методика, позволяющая получить обедненные эндосомами фракции аппарата Гольджи, описана в разд. 5.7 (табл. 1.12; рис. 1.8).

5.6. Окаймленные везикулы

Происхождение окаймленных везикул, получаемых из тканевых гомогенатов, до конца неясно, но, по всей вероятности, их источником являются окаймленные участки мембраны; здесь можно провести аналогию с образованием микросом из эндоплазматического ретикулума. Обычно это везикулы диаметром 70—200 нм с характерной покрывающей их «сетчатой корзиной»; эта структура имеет тенденцию вытесняться с подлежащей мембраны (см. ниже). Размер везикул варьирует в зависимости от того, происходят ли они из плазматической мембраны (диаметр превышает 100 нм) или из аппарата Гольджи (диаметр менее 75 нм) [144]. Окаймленные везикулы обогащены холестерином [145] и содержат клатрин — белок с мол. массой 180 000 [146].

Выделение окаймленных везикул облегчается тем, что они имеют высокую плотность. Для получения фракции окаймленных везикул имеется тщательно разработанная методика; процедура занимает 36 ч и включает зонально-скоростное и изопикническое — зонально-скоростное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы [42]. Выделение окаймленных

везикул из плаценты человека описано в табл. 1.11. Аналогичным образом можно выделять окаймленные везикулы из тканей мозга [146]. Каемка при выделении обнаруживает тенденцию к разрушению и формированию клатриновых «корзинок», причем этот процесс более выражен при длительном центрифугировании в 20—60%-ном (в/о) градиенте плотности сахарозы. Исследовано влияние различных агентов на этот процесс [148]. Если при выделении использовать центрифугирование в градиенте плотности сахарозы $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ — 8%, то можно в значительной мере

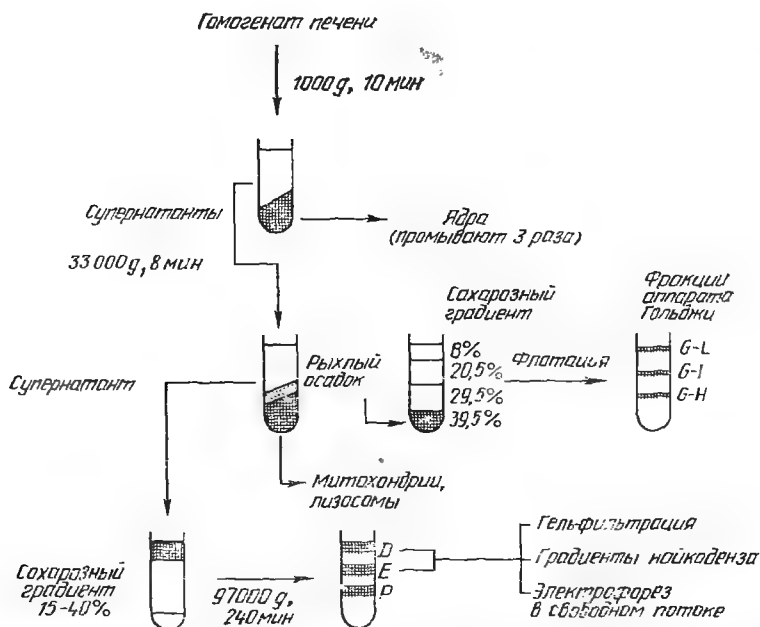


Рис. 1.8. Выделение эндосом и обедненных эндосомами фракций аппарата Гольджи из печени. Объяснения к схеме см. в табл. 1.12.

предотвратить разрушение везикул из мозга быка [42] и печени крысы [149]. Для выделения окаймленных везикул необходимо большое количество ткани; например, для печени выход составляет 1—2 мг белка на 40 г печени [150]. Окончательная очистка проводится так, как описано в табл. 1.11, или с применением проникающей (адсорбционной) хроматографии на колонке с сефакрилом, что позволяет отделить окаймленные везикулы от гладких [149] (разд. 3.3); можно провести электрофорез в агарозном геле (разд. 3.4) [113, 115] или иммуноадсорбцию (гл. 3).

Таблица 1.11. Выделение окаймленных везикул из плаценты человека¹⁾

1. Берут зрелую плаценту и измельчают 250 г ворсиком без мембран, пуповины и кровеносных сосудов.
2. Гомогенизируют ткань в равном объеме буфера 1 [1 mM ЭГТА, 5 mM $MgCl_2$, $NaNO_3$ (0,2 мг/мл), 0,1 M МЭС, pH 7,4] в гомогенизаторе для измельчения тканей в три приема по 10 с при полной скорости.
3. Центрифугируют гомогенат при 15 000 g 40 мин. Собирают супернатант и центрифугируют его при 85 000 g 1 ч.
4. Ресуспенсируют осадок (в гомогенизаторе Даунса) в 40 мл буфера 1 и насливают его на ступенчатый градиент сахарозы, состоящий из следующих растворов сахарозы в буфере 1: 60% (в/о), 4,5 мл; 50%, 4,5 мл; 40% 9 мл; 10%, 9 мл; 5%, 4,5 мл. Центрифугируют в роторе Вексман SW 28 (или аналогичном) при 100 000 g 70 мин.
5. Собирают материал, находящийся на границе раздела растворов сахарозы с концентрацией 10 и 40%, а также материал, находящийся в самих этих растворах. Разводят в три раза буфером 1 и центрифугируют при 100 000 g 1 ч.
6. Ресуспенсируют осадок в 9 мл буфера 1, оценивают содержание белка и добавляют агглютинин из зародышей пшеницы (1 мг на 10 мг мембранного белка). Оставляют на 2 ч при комнатной температуре или на ночь при 4 °C и осаждают агглютинированный материал центрифугированием при 20 000 g 15 мин. Собирают супернатант и центрифугируют при 165 000 g 1 ч.
7. Ресуспенсируют последний осадок в 1,5 мл буфера 1. Выход составляет около 3 мг белка.

¹⁾ Из работы [147].

5.7. Эндосомы (эндоцитозные везикулы)

Эндосомы (рецептосомы, пиносомы) — это мембранные везикулы, происходящие из эндоцитозных мембранных сетей. Последние представляют собой везикулярно-тубулярную систему, простирающуюся от плазматической мембраны внутрь клетки. Эта система участвует в переносе и сортировке комплексов рецептор — лиганд после эндоцитоза [8].

В разд. 3.1.1 описан метод изменения плотности для получения единой популяции эндосом печени. Другой метод, в котором не применяются связанные с пероксидазой лиганды для модификации плотности и в котором получают три субфракции эндосом печени, представлен в табл. 1.12 и на рис. 1.8. В разд. 3.1.1 подробно изложено использование градиентов найкоденза для отделения содержащих лиганды безрецепторных эндосом от везикул с рецепторами.

Биохимические свойства эндосомных мембран известны далеко не полностью. Перфузия печени различными мечеными иодом лигандами и прослеживание их субклеточной локализации в эндосомах (асialogликопротеины, полипептидные гормоны и т. д.) показывают, что эти лиганды в эндосомах не разрушаются; это свидетельствует об отсутствии высокоактивных

Таблица 1.12. Выделение эндосом печени и мембран аппарата Гольджи, объединенных эндосомами (рис. 1.8)

1. Препарируют две печени крысы (~15—20 г сырого веса), измельчают ножницами и гомогенизируют в гомогенизаторе Даунса (объем 35 мл, зазор 0,12 мм; Blaessig, Rochester, NY, USA) 10 ходами пестика в 0,2 М сахарозе (три объема на 1 г сырого веса).
2. Фильтруют гомогенат через нейлоновую марлю 50—100 меш (Swiss Silk Bolting Cloth Manufacturing Co. Ltd, Zurich, Switzerland) и проводят повторную гомогенизацию шестью ходами плотно притертого пестика (зазор 0,07 мм).
3. Центрифугируют гомогенат в поликарбонатных пробирках в угловом роторе 8×50 мл (Sorvall SS-34 или аналогичном) при 1000 g 10 мин; дважды промывают осадок, ресуспендируя его (1,5 объема на 1 г сырого веса печени) и центрифугируя в 0,25 М сахарозе; объединяют супернатанты (их объем составляет ~100 мл).
4. Центрифугируют объединенные супернатанты при 33 000 g 8 мин в роторе типа Beckman. Если центрифуга снабжена программным устройством, устанавливают ее на $2,61 \cdot 10^6 \text{ рад}^2/\text{с}$. Собирают супернатант, стараясь не захватить рыхлый материал, остающийся поверх многослойного осадка.
5. Наслаивают супернатант на шесть градиентов сахарозы в пробирках по 38 мл (ротор Beckman SW 28). Градиенты формируют следующим образом: берут 1 мл 70%-ной (в/о) сахарозы и 5 мл 43%-ной сахарозы, затем смешиванием 7,5 мл 40- и 10%-ной сахарозы создают непрерывный градиент.
6. Центрифугируют при 100 000 g 4 ч. Собирают фракции (40 фракций по 0,7 мл), проткнув дно пробирки иглой шприца, подсоединенного к перистальтическому насосу.
7. Объединяют фракции, имеющие плотности 1,095—1,117 и 1,117—1,135 г/мл, чтобы получить фракцию эндосом. Если клетки печени поглотили путем эндоцитоза меченные радиоактивным иодом лиганды (например, асialogликопротеины, полипептидные гормоны), которые были введены на 2—10 мин в порталную вену, то эти соединения обнаруживаются в нерасщепленном виде в материале с указанными плотностями. Связь между концентрацией сахарозы и плотностью раствора приведена в Приложении 1.
8. Субфракционируют эндосомы, используя градиенты найкоденза (разд. 3.1.1.). Получают фракции аппарата Гольджи (объединенные эндосомами), собрав рыхлую часть осадка (п. 4), и ресуспендируют в слабо притертом гомогенизаторе Даунса в 50 мл 39%-ной (в/о) сахарозы. Разливают эту суспензию в шесть центрифужных пробирок на 38 мл (Beckman SW 28), а сверху наслаивают равные объемы следующих растворов сахарозы: 29,5%, 20,5 и 8%. Центрифугируют при 100 000 g 3 ч и собирают тяжелую фракцию аппарата Гольджи в полосе 29,5—39%, а промежуточную фракцию — в полосе 20,5—29,5%.

протеолитических ферментов в везикулах низкой плотности. Эндосомы не содержат тех ферментов-маркеров, которые характерны для внутриклеточных органелл и мембран [77, 78, 84, 150]. Их трудно полностью отделить от компонентов аппарата Гольджи из-за близости плотностей. Маркером эндосомных фракций печени может служить активируемая монойсином Mg^{2+} -АТРаза — протонный насос, ответственный за подкисление содержимого эндосом [77]. Анализ мембран эндосом показал, что они ближе по своим свойствам к плазматическим мембранам, чем

какие-либо другие мембраны, поскольку содержат холестерол и сфингомиелин; однако в мембранах эндосом присутствует меньше белков, чем в плазматических мембранах [119].

В настоящее время охарактеризованы в основном эндосомные мембраны печени и описаны методы получения их из клеток в культуре [151], макрофагов [49, 50] (табл. 1.5) и других клеток.

5.8. Плазматические мембраны

Плазматическая мембрана — это, по-видимому, наиболее сложная и дифференцированная клеточная мембранная система, представляющая собой непрерывную совокупность функционально различающихся областей. Особенно это относится к клеткам тех тканей и органов, где апикальные и базолатеральные зоны разделяются областью плотного контакта и обнаруживают различия в биохимических свойствах [4, 5]. Кроме того, существуют также микродомены, такие, как микроворсинки и окаймленные ямки (разд. 5.6), а также различные типы межклеточных контактов. Доменная организация просматривается также в изолированных клетках в культуре. Было осуществлено разделение и биохимический анализ плазматических мембран клеток HeLa [7], лимфоцитов [152, 153] и яйцеклеток китайского хомьчка [154].

Методики получения плазматических мембран исключительно разнообразны, и здесь можно говорить только об основных направлениях их развития. В таблице 1.13 приведен список работ, посвященных выделению плазматических мембран и других фракций из разных тканей, органов и клеток в культуре.

1. Условия гомогенизации тканей и клеток при выделении плазматических мембран следует тщательно выбирать и жестко контролировать. Во время гомогенизации может произойти разрушение плазматической мембраны и образоваться полидисперсная смесь частиц с изменяющимися физическими и биохимическими свойствами; это значительно затруднит дифференциальное центрифугирование. Основное направление, которого следует придерживаться, работая с тканями и органами, состоит в подборе способа гомогенизации, позволяющего получать крупные мембранные фрагменты, осаждающиеся при низкой скорости (вместе с ядрами). Везикулы плазматической мембраны, находящиеся в микросомной фракции, очистить гораздо труднее.

2. Разработаны быстрые методы выделения плазматических мембран, которые позволяют обойтись без субклеточного фракционирования. Они основаны на высвобождении в среду (разд. 2.1.1) или присоединении к твердой фазе (разд. 2.1.2)

участков клеточной поверхности. Эти методы применяются только в случае суспендированных клеток. Кроме того, существует опасность, что отделившиеся от клеток везикулы будут нерепрезентативными в смысле состава мембран, а везикулы, присоединенные к твердому субстрату (например, к шарикам, покрытым полилизинном), будет трудно освободить.

3. Большие успехи достигнуты при выделении плазматических мембран благодаря использованию изоосмотических градиентов перколла, найкоденза и т. д.; особенно эффективны эти методики при выделении плазматических мембран из постъядерной фракции (разд. 3.1.1). Хотя выделение, осуществляемое с помощью этих новых материалов для градиентов, бесспорно выигрывает в скорости, необходимо иметь в виду, что фракции, так или иначе собираемые из легкой области градиента (в перколле это плотности 1,02—1,04 г/мл), по-видимому, загрязнены мембранами эндосом и аппарата Гольджи.

4. Везикулы, выделенные быстро и в изоосмотических условиях (в градиенте перколла), можно использовать для последующих исследований транспорта ионов и молекул через плазматические мембраны. Эти исследования значительно облегчаются тем, что из плазматической мембраны образуются везикулы преимущественно правильной ориентации, что обусловлено ее в высшей степени асимметричной организацией.

5. При выделении плазматических мембран из тканей, для которых характерны функциональное и ферментативное разнообразие (например, базолатеральные и апикальные участки эпителиальных клеток [4, 5]), крайне желательно установить доменное происхождение выделенных фракций (табл. 1.13).

6. Помимо регистрации активности ферментов-маркеров (Приложение II) для контроля за выделением плазматических мембран из клеток весьма полезно использовать радиоактивные метки, ковалентно пришитые к целым клеткам. Такими метками служат реагенты, которые связываются с поверхностными клеточными белками [155, 156] или углеводами [157]. Чтобы контролировать процесс и ограничить проникновение свободной и модифицированной метки внутрь клеток, обработку проводят при 4 °С, поскольку это уменьшает вероятность эндоцитоза компонентов плазматической мембраны. Ковалентное мечение мембранных белков и гликопротеинов описано в гл. 6.

5.8.1. Контакты плазматической мембраны

Для выделения комплексов межклеточных контактов из различных тканей вначале получают фракцию плазматической мембраны, содержащую мембранные фрагменты латеральных доменов, а затем обрабатывают ее детергентами, чтобы избира-

Таблица 1.13. Работы, в которых описаны методики выделения субклеточных органелл и мембран

Источник (орган, вид и т. д.)		Ссылка
А. Плазматические мембраны		
Адипозная ткань	Жировые подушки, бурый жир	[71, 160]
Хромаффинная ткань	Бык	[161]
Мозг	Аксолемма (крыса)	[162]
	Кора головного мозга (крыса)	[163]
	Хвостатое ядро (бык)	[164]
Колоноциты	Крыса	[172]
Желтое тело	Бык, крыса	[165, 166]
Яйцеклетки	Морской еж	[167]
Эмбриональные ткани	Мезенхима (мышь)	[168]
Эпидермис	Мальпигиевы клетки (свинья)	[169]
Эпителиальные клетки	LLC-PK-клетки почек (свинья)	[170]
Эритроциты	Человек	[171]
Клетки экзорбитальной железы	Базолат. область, щеточная каемка (крыса)	[46]
Фибробласты	(мышь); легкие (хомячок)	[173, 174]
Клетки миокарда	Крыса, псовые	[175, 176]
HeLa		[177]
Кишечник	Щеточная каемка (крыса) базолатеральная область	[178, 180]
		[179, 121]
Почка	Щеточная каемка (мышь) базолатеральная область (крыса)	[181]
		[182, 197]
Хрусталик	Различные виды	[183]
Клетки Лейтре		[184]
Печень	Синусоиды (крыса)	[185]
	Клетки канальцев, базолатеральная область	[32, 33, 94, 185, 186]
Легкое	Крыса	[187, 188]
Лимфоциты	(мышь); тимус (теленка)	[189, 190]
Тучные клетки	Крыса	[31]
Нейробластома	Мышь	[191]
Нейтрофилы	Человек, псовые, свинья	[192—194]
Околоушная железа	Крыса	[195, 196]
Плацента	Синцитиотрофобласт (человек)	[198, 199]
		[200]
Тромбоциты		[201]
Скелетные мышцы	Кролик	[202]
Гладкие мышцы	Разные источники	[203]
Желудок	Свинья	[204]
Сперма	Мышь	[205]
Опухолевые клетки	HSV, хомячок, асцитные опухоли	[206, 207]

Продолжение

Источник (орган, вид и т. д.)		Ссылки
Б. Межклеточные соединения		
Десмосомы	Слизистая носа (корова)	[157, 158, 208]
Щелевые контакты	Печень, сердце, матка (крыса)	[29, 139, 209]
Плотные контакты	Печень (мышь)	[210]
Постсинаптические уплотнения	Собака, мышь, другие виды	[96, 211, 212]
Триадная структура скелетных мышц	Кролик	[213]
В. Лизосомы и аутофагические вакуоли		
Фибробласты	Человек	[109]
Щитовидная железа	Свинья	[214]
Печень	Крыса	[75, 108]
Печень	Аутофагические вакуоли (крыса)	[131, 132, 215]
Почка	Крыса	[51]
Легкое	Кролик	[226]
Г. Пероксисомы		
Печень	Мышь, различные виды, карп	[44, 136, 139]
Сердце	Крыса	[136]
Д. Митохондрии		
Печень	Крыса	[127, 216]
Сердце	Корова	[217]
Миометрий	Человек	[218]
Е. Ядерные мембраны		
Печень	Крыса	[122, 123]
Ж. Аппарат Гольджи		
Печень	Крыса	[55, 111, 140, 141]
Мозг	Крыса	
Лейкозные клетки		[227]
		[219]
З. Вакуоли, гранулы, тельца и т. д.		
Клетки островков поджелудочной железы	Секреторные зимогеновые гранулы (крыса)	[220]
Околоушная железа	Крыса	[221]
Хромаффинная ткань	Секреторные гранулы	[47, 222]
Гипофиз	Секреторные везикулы	[76]
Vas deferens	Норадреналиновые гранулы	[224]
Конусы роста аксонов	Передний мозг (крыса)	[225]
Ламеллярные тельца	Легкое кролика	[226]

Дальнейшие подробности и ссылки приведены в табл. 1.4 и разд. 5.

тельно солиubilизировать не содержащие контактов мембраны. При этом мембраны, содержащие контакты, остаются в осадке. Существуют и альтернативные методы без применения детергентов. Например, десмосомы выделяют из нозального эпидермиса коровы путем экстракции цитратным буфером при pH 2,6 [158], а щелевые контакты получают из плазматических мембран печени экстракцией 20 mM NaOH [159].

6. Заключение и перспективы

Описаны разнообразные методики выделения и характеристики большинства органелл и мембранных систем животных клеток. Их можно подразделить на две основные категории. Во-первых, это относительно простые и быстрые методы, в основе которых лежит получение мембранных фрагментов, свободных или связанных с заряженными, покрытыми лигандами или антителами гранулами, и быстрое (30 мин — 1 ч) фракционирование гомогенатов в градиентах плотности новых материалов в изотонических условиях в водной одно- или двухфазной системе. Высокая скорость выделения может быть сопряжена с некоторым ухудшением степени очистки фракций; тем не менее с помощью этих методов несомненно можно получать качественный материал для дальнейших исследований (например, транспорта и механизмов рецепции), особенно когда изучаемый биологический процесс или молекулы нестабильны. Ко второй группе относятся методы, разработанные в первую очередь для дальнейшего разделения (субфракционирования) первичных фракций (например, электрофорез в свободном потоке, методы, основанные на изменении плотности и т. д.). Хотя они требуют дополнительной работы с мембранами, что может привести к их повреждению, эти методы оказались особенно ценными для получения эндосом, окаймленных везикул и фракций аппарата Гольджи.

В заключение отметим следующее. Несмотря на существование многочисленных биохимических маркеров, в перспективе для идентификации и контроля качества полученных мембранных препаратов будут применяться антитела против компонентов выделенной фракции (органеллоспецифические антитела), скомпонованные как иммунодиагностический набор. Дальнейшее развитие получит весьма перспективное направление — выделение высокоочищенных мембранных доменов с помощью намагниченных гранул или созданных биоинженерными методами полимеров с пришитыми антителами, специфичными для мембран конкретных органелл (гл. 3). Успешная разработка комплексной методики — сочетания иммунологических методов, основанных на функциональных, а не на физических особенно

стях мембран, и метода проточной цитометрии (флуоресцентная сортировка частиц)— неизмеримо расширит возможности выделения дискретных мембранных доменов из различных органелл.

Литература

1. Weibel E. R., Staubl W., Gnagl H. R., Hess F. A. (1969). *J. Cell Biol.*, **42**, 68.
2. Farquhar M., Palade G. E. (1981). *J. Cell Biol.*, **91**, 77s.
3. Griffiths G., Simons K. (1986). *Science*, **234**, 438.
4. Evans W. H. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 27.
5. Simons K., Fuller S. D. (1985). *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 243.
6. Szamel M., Goppelt M., Resch K. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **821**, 479.
7. Mason P. W., Jacobson B. S. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **821**, 264.
8. Wileman T., Harding C., Stahl P. (1985). *Biochem. J.*, **232**, 1.
9. Evans W. H. (1978). *Preparation and Characterisation of Mammalian Plasma Membranes*. Elsevier, Amsterdam.
10. Coleman P. S., Lavietes B. B. (1981). *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **11**, 341.
11. Van Blitterswijk W. J., Emmelot P., Hilkmann H. A. M., Oomen-Meulemans E. P. M., Inbar M. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **467**, 309.
12. Koch G. L. E., Smith M. J. (1978). *Nature*, **273**, 274.
13. Pan B. T., Johnstone R. M. (1983). *Cell*, **33**, 967.
14. Cohen S., Ushiro H., Stoscheck C., Chinkers M. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 1523.
15. Scott R. E., Perkins R. G., Zschunke M. A., Hoerl B. J., Maercklein P. B. (1979). *J. Cell Sci.*, **35**, 229.
16. Stephen S. G., Cone R. E. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6582.
17. Leonards K. S., Ohki S. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **728**, 383.
18. Kobayashi T., Okamoto H., Yamada J. I., Setaka M., Kwan T. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **778**, 210.
19. Grivell A. R., Berry M. N., Henly D. C., Phillips J. W., Wallace P. G., Gannon P. J., Henderson D. W., Mukherjee T. M., Swift J. G. (1986). *Exp. Cell Res.*, **165**, 11.
20. Simpson A. J. G., Schreyer M. D., Cesari I. M., Evans W. H., Smithers S. R. (1981). *Parasitology*, **83**, 163.
21. Kalish D. I., Cohen C. M., Jacobson B. S., Branton D. (1978). *Biochim. Biophys. Acta*, **506**, 97.
22. Ohnishi T., Suzuki T., Suzuki Y., Ozawa K. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **684**, 67.
23. Gotlib L. J. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **685**, 21.
24. Jacobson B. S. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 769.
25. Gotlib L. J., Searls D. B. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **602**, 207.
26. Stewart D. I. H., Crawford N. (1981). *FEBS Lett.*, **126**, 175.
27. Chaney L. K., Jacobson B. S. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 10062.
28. Lindsay J. G., Reid G. P., D'souza M. P. (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 791.
29. Zervos A. S., Hope J., Evans W. H. (1985). *J. Cell Biol.*, **101**, 1363.
30. Cutvenor J. G., Mandel T. E., Whitelow A., Ferber E. (1982). *J. Cell. Biochem.*, **20**, 127.
31. Amende L. M., Donlon M. A. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 713.
32. Meier P. J., Sztul E. S., Reuben A., Boyer J. L. (1984). *J. Cell Biol.*, **98**, 991.
33. Brandt N., Basset A. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 872.
34. Steiger B., Murer H. (1983). *Eur. J. Biochem.*, **135**, 95.
35. Record M., Bes J. C., Chap H., Douste-Blazy L. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 57.

37. Barret A. J. (1980). In: Protein Degradation in Health and Disease. CIBA Foundation Symposium 75, p. 1.
38. Aubry H., Merrill A. R., Proulx P. (1986). *Biochim. Biophys. Acta*, **856**, 610.
39. Yeaton R. W., Lipari M. T., Fox C. F. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 9254.
40. Manjunath C. K., Goings G. E., Page E. (1985). *J. Membr. Biol.*, **85**, 159.
41. Sheeler P. (1981). *Centrifugation in Biology and Medicine*, John Wiley, New York.
42. Nandi P. K., Irace G., Van Jaarsveld P. P., Lippoldt R. E., Edelhoeh H. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5881.
43. Johnstone A. P., Crumpton M. J. (1980). *Biochem. J.*, **190**, 45.
44. Hajra A. K., Wu D. (1985). *Anal. Biochem.*, **148**, 233.
45. Conteas C. N., McDonough A. A., Kozlowski T. R., Hensley C. B., Wood R. L., Mircheff A. K. (1986). *Am. J. Physiol.*, **250**, C430.
46. Mircheff A. K., Lu C. C., Conteas C. N. (1983). *Am. J. Physiol.*, **245**, G661.
47. Gratzl M., Krieger-Brauer H., Ekerdt R. (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 355.
48. Loten E. G., Redshaw-Loten J. C. (1986). *Anal. Biochem.*, **154**, 183.
49. Wileman T., Boshans R. L., Schliesinger P., Stahl P. (1984). *Biochem. J.*, **220**, 665.
50. Diment S., Stahl P. (1985). *J. Biol. Chem.*, **260**, 15311.
51. Harikumar P., Reeves J. P. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 10403.
52. Carly S. E., Johnson R. G., Scarpa A. (1980). *Anal. Biochem.*, **106**, 438.
53. Renswoude J. V., Bridges K. V., Harford J. B., Klausner R. D. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6186.
54. Oppendoes F. (1981). *Mol. Biochem. Parasitol.*, **3**, 181.
55. Khan M. N., Posner B. I., Khan R. J., Bergeron J. J. M. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 5969.
56. Kay D. G., Khan M. N., Posner B. I., Bergeron J. J. M. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 1144.
57. Deutscher S. L., Crik K. E., Meirion M., Hirschberg C. B. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3938.
58. Yamada H., Hayashi H., Natori Y. (1984). *J. Biochem. (Tokyo)*, **95**, 1155.
59. Harms E., Kartenbeck J., Darai G., Schneider J. (1981). *Exp. Cell Res.*, **131**, 251.
60. Alquier C., Guenin P., Munari-Silem Y., Audebet C., Rousset B. (1985). *Biochem. J.*, **232**, 529.
61. Stocco D. M. (1983). *Anal. Biochem.*, **131**, 453.
62. Reinhart P. H., Taylor W. M., Bygrave F. L. (1982). *Biochem. J.*, **204**, 731.
63. Mickelson J. R., Greaser M. L., Marsh B. B. (1980). *Anal. Biochem.*, **109**, 255.
64. Neat C. E., Thomassen M. S., Osmundsen H. (1980). *Biochem. J.*, **186**, 369.
65. Perret B., Hugnes J. C., Douste-Blazy L. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 434.
66. Epping R. J., Bygrave F. L. (1984). *Biochem. J.*, **223**, 733.
67. Brockbank K. J., England P. J. (1980). *FEBS Lett.*, **122**, 67.
68. Boumendil-Podevin E. F., Podevin R. A. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **735**, 86.
69. Chakravarthy B. R., Spence M. W., Clarke J. T. R., Cook H. W. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 223.
70. Nagy A., Delgado-Escueta A. V. (1984). *J. Neurochem.*, **43**, 1114.
71. Belsham G. J., Denton R. M., Tanner M. J. A. (1980). *Biochem. J.*, **192**, 457.
72. Storrle B., Pool R. R., Sachdeva M., Maurey K. M., Oliver C. (1984). *J. Cell Biol.*, **98**, 108.
73. Magun B. E., Planck S. R., Wagner H. N. (1982). *J. Cell. Biochem.*, **20**, 259.

74. Rickwood D., ed. (1983). Iodinated Density Gradient Media. IRL Press, Oxford.
75. Wattiaux R., Wattiaux-De Coninck S., Ronveaux-Dupal M. F., Dubois F. (1978). J. Cell. Biol., 78, 349.
76. Loh Y. P., Tam W. W. H., Russell J. T. (1984). J. Biol. Chem., 259, 8238.
77. Saermark T., Flint N., Evans W. H. (1985). Biochem. J., 225, 51.
78. Evans W. H., Flint N. (1985). Biochem. J., 232, 25.
79. Lange Y., Steck T. L. (1985). J. Biol. Chem., 260, 15592.
80. Harrison E. H., Bowers W. E. (1983). J. Biol. Chem., 258, 7134.
81. Cotman C., Kelly R. T. (1980). In: The Cell Surface and Neuronal Function. Cotman C. W., Poste G., Nicholson G. L. (eds.), Elsevier, North Holland, Amsterdam, p. 506.
82. Lardeux B., Gouhot B., Forestier M. (1983). Anal. Biochem., 131, 160.
83. Roseblatt M., Hidalgo C., Vergara C., Ikemoto N. (1981). J. Biol. Chem., 256, 8140.
84. Courtoy P. J., Quintart J., Baudhuin P. (1984). J. Cell Biol., 98, 870.
85. Wilson G. (1978). J. Biol. Chem., 253, 2070.
86. Beardmore J. M., Howell K. E., Miller K., Hopkins C. R. (1986). EMBO J., 5, 3091.
87. Helmy S., Porter-Jordan K., Dawidowicz E. A., Pilch P., Schwartz A. L., Fine R. E. (1986). Cell, 44, 497.
88. Sheeler P., Schultz S. (1984). Am. Lab., Oct. issue.
89. Albertsson P. A., Andersson B., Larsson C., Akerlund H. E. (1982). Methods Biochem. Anal., 28, 115.
90. Brunette D. M., Till J. E. (1971). J. Membr. Biol., 5, 215.
91. Gruber M. Y., Cheng K. H., Lepock J. R., Thompson J. E. (1984). Anal. Biochem., 138, 112.
92. Glossmann H., Gips H. (1974). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 282, 439.
93. Hino Y., Asano A., Sato R. (1978). J. Biochem. (Tokyo), 83, 935.
94. Gierow P., Sommarin M., Larsson C., Jergil B. (1986). Biochem. J., 235, 685.
95. Lopez-Perez M. J., Paris G., Larsson C. (1981). Biochim. Biophys. Acta, 635, 359.
96. Gurd J. W., Gordon-Weeks P., Evans W. H. (1982). J. Neurochem., 22, 281.
97. Heywood-Waddington D., Sutherland I. A., Morris I. B., Peters T. J. (1984). Biochem. J., 217, 751.
98. Johansson G. (1976). Biochim. Biophys. Acta, 451, 517.
99. Flanagan S. D., Johansson G., Yost B., Ito Y., Sutherland I. A. (1984). J. Liquid Chromatogr., 7, 385.
100. Olde B., Johansson G. (1985). Neuroscience, 15, 1247.
101. Carlson S. S., Wagner J. A., Kelly R. B. (1978). Biochemistry, 17, 1188.
102. Ohsawa K., Kano A., Hoshi T. (1979). Life Sci., 24, 669.
103. Reynolds J., Nozaki Y., Tanford C. (1983). Anal. Biochem., 130, 471.
104. Steer C. J., Bisher M., Blumenthal R., Steven A. (1984). J. Cell Biol., 99, 315.
105. Hannig K. (1982). Electrophoresis, 3, 235.
106. Brunner G., Heidrich H. G., Golecki J. R., Bauer H. C., Suter D., Pluckhahn P., Ferber E. (1977). Biochim. Biophys. Acta, 471, 195.
107. Stewart D. I. H., Crawford N. (1983). Biochim. Biophys. Acta, 733, 154.
108. Hostetter K. Y., Reasor M., Yazaki P. J. (1985). J. Biol. Chem., 260, 215.
109. Harms E., Kern H., Schneider J. A. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6139.
110. Heidrich H. G., Leutner G. (1974). Eur. J. Biochem., 41, 37.
111. Morré D. J., Morré D. M., Heidrich H. G. (1983). Eur. J. Cell Biol., 31, 263.

112. *Crawford N.* (1985). In: *Cell Electrophoresis*. Schutt W., Klinkmann H. (eds.), Walter de Gruyter, Berlin, p. 225.
113. *Rubenstein J. L. R., Fine R. E., Luskey B. D., Rothman J. E.* (1981). *J. Cell Biol.*, **89**, 357.
114. *Kedersha N. L., Rome L. H.* (1986). *Anal. Biochem.*, **156**, 161.
115. *Kedersha N. L., Hill D. F., Kronquist K. E., Rome L. H.* (1986). *J. Cell Biol.*, **103**, 287.
116. *de Duve C.* (1983). *Eur. J. Biochem.*, **137**, 391.
117. *Smith G. D., Peters T. J.* (1980). *Eur. J. Biochem.*, **104**, 305.
118. *Howell K., Ito A., Palade G. E.* (1978). *J. Cell Biol.*, **79**, 581.
119. *Evans W. H., Hardison W. G. M.* (1985). *Biochem. J.*, **232**, 33.
120. *Croze E. M., Morré D. J.* (1984). *J. Cell Physiol.*, **119**, 46.
121. *Moktari S., Feracci H., Gorvel J. P., Mishal Z., Rigal A., Maroux S.* (1986). *J. Membr. Biol.*, **89**, 53.
122. *Kaufmann S. H., Gibson W., Shaper J. H.* (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 2710.
123. *Richardson J. C. W., Agutter P. S.* (1980). *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 459.
124. *Bachmann M., Bernd A., Schroder H. C., Zahn R. K., Muller W. E. G.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 308.
125. *Johnson D., Lardy H. A.* (1967). *Methods Enzymol.*, **10**, 94.
126. *Sandri G., Panfili E., Sottocassa G. L.* (1978). *Bull. Mol. Biol. Med.*, **3**, 179.
127. *Gellerfors P., Linden M.* (1981). *FEBS Lett.*, **127**, 91.
128. *Henning R., Plattner H.* (1974a). *Biochim. Biophys. Acta*, **354**, 114.
129. *Lardeux B., Gouhot B., Forestier M.* (1983). *Anal. Biochem.*, **131**, 160.
130. *Takano T., Muto K., Imanaka T., Ohkuma S.* (1982). *Biochem. Int.*, **4**, 485.
131. *Marzella L., Ahlberg J., Glaumann H.* (1982). *J. Cell Biol.*, **93**, 144.
132. *Furuno K., Ishikawa T., Kato K.* (1982). *J. Biochem. (Tokyo)*, **91**, 1943.
133. *Lazarow P. B., Fujiki Y.* (1985). *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 489.
134. *Small G. M., Hocking T. J., Sturdee A. P., Burdett K., Connock M. J.* (1981). *Life Sci.*, **28**, 1875.
135. *Goldenberg H., Kollner U., Krammer R., Pavelka M.* (1978). *Histochemistry*, **56**, 253.
136. *Connock M. J., Perry S. R.* (1983). *Biochem. Int.*, **6**, 545.
137. *Volki A., Fahimi H. D.* (1985). *Eur. J. Biochem.*, **149**, 257.
138. *Fujiki Y., Fowler S., Shio L., Hubbard A., Lazarow P.* (1982). *J. Cell Biol.*, **93**, 103.
139. *Crane D. I., Hemsley A. C., Masters C. J.* (1985). *Anal. Biochem.*, **148**, 436.
140. *Morré D. J.* (1971). *Methods Enzymol.*, **22**, 130.
141. *Bergeron J. J. M.* (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 493.
142. *Fujiki Y., Hubbard A. L., Fowler S., Lazarow P. B.* (1982). *J. Cell Biol.*, **93**, 97.
143. *Howell K. E., Palade G. E.* (1982). *J. Cell Biol.*, **92**, 822.
144. *Steer C. J., Wall D. A., Ashwell G.* (1983). *Hepatology*, **3**, 667.
145. *Alfsen A., de Paillerets C., Prasad K., Nandi P. K., Lippoldt R. E., Edel-hoch H.* (1984). *Eur. Biophys. J.*, **11**, 129.
146. *Pearse B. M. F.* (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 451.
147. *Booth A. G., Wilson M. J.* (1981). *Biochem. J.*, **196**, 355.
148. *Woodward M. P., Roth T. F.* (1979). *J. Supramol. Struct.*, **11**, 237.
149. *Steer C. J., Bisher M., Blumenthal R., Steven A. C.* (1984). *J. Cell Biol.*, **99**, 315.
150. *Hadjiivanova N., Flint N., Evans W. H., Dix C., Cooke B. A.* (1984). *Biochem. J.*, **222**, 749.
151. *Sun I., Morré D. J., Crane F. L., Safranski K., Croze E. M.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **797**, 266.

151. Dickson R. B., Hanover J. A., Pastan I., Willingham M. (1985) *Methods Enzymol.*, **109**, 257.
152. Resch K., Loracher A., Mahler B., Stoeck M., Rode H. N. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **511**, 176.
153. Hoessli D. C., Rungger-Brandle E. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 439.
154. Horst M. N., Braumbach G. A., Olympio M. A., Roberts R. M. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 48.
155. Morrison M. (1974). *Methods Enzymol.*, **32B**, 103.
156. Hubbard A. L., Cohn Z. A. (1976). In: *Biochemical Analysis of Membranes*. Maddy A. H. (ed.), Chapman and Hall, London, p. 427.
157. Carraway K. L. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 379.
158. Skerrow C. J., Matoltsy A. G. (1974). *J. Cell Biol.*, **63**, 524.
159. Hertzberg E. L. (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 9936.
160. Giacobino J. P., Perrelet A. (1971). *Experientia*, **27**, 259.
161. Zinder O., Hoffman P. G., Bonner W. M., Pollard H. B. (1978). *Cell Tissue Res.*, **188**, 153.
162. de Vries G. H., Matthieu J. M., Beny M., Chickeportiche R., Lazdunski M., Dalivo M. (1978). *Brain Res.*, **147**, 339.
163. Dodd P. R., Hardy J. A., Oakley A. E., Edwardson J. A., Perry E. K., De-launoy J. P. (1981). *Brain Res.*, **226**, 107.
164. Gregg M. R., Spanner S., Ansell G. B. (1982). *Neurochem. Res.*, **7**, 1045.
165. Gospodarowicz D. (1973). *J. Biol. Chem.*, **248**, 5042.
166. Bramley T. A., Ryan R. J. (1980). *Mol. Cell Endocrinol.*, **19**, 21.
167. Ribot H., Decker S. J., Kinsey W. H. (1983). *Dev. Biol.*, **97**, 494.
168. Wright J. T., Elmer W. A., Dunlop A. T. (1982). *Anal. Biochem.*, **125**, 100.
169. Gray G. M., King I. A., Yardley H. J. (1980). *Br. J. Dermatol.*, **103**, 505.
170. Brown C. D. A., Bodmer M., Biber J., Murer H. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 471.
171. Habahan D. J., Ekholm J. E. (1978). *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 170.
172. Brasitus T. A., Keresztes R. S. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 290.
173. Gruber M. Y., Cheng K. A., Lepock J. R., Thompson J. E. (1984). *Anal. Biochem.*, **138**, 112.
174. Marggraf W. D., Anderer F. A., Kanfer J. N. (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, **664**, 61.
175. Mansier P., Charlemagne D., Rossi B., Preteseille M., Swynghedauw B., Lelievre L. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 6628.
176. Weglicki W. B., Owens K., Kennett F. F., Kessner A., Harris L., Wise R. M., Vahouny G. V. (1980). *J. Biol. Chem.*, **255**, 3605.
177. Constantino-Ceccarini E., Novikoff P. M., Atkinson P. H., Novikoff A. (1978). *J. Cell Biol.*, **77**, 448.
178. Stieger B., Murer H. (1983). *Eur. J. Biochem.*, **135**, 95.
179. Scalera V., Storelli C., Storelli-Joss C., Haase W., Murer H. (1980). *Biochem. J.*, **186**, 177.
180. Fujita M., Ohta H., Uezato T. (1981). *Biochem. J.*, **196**, 669.
181. Fujita M., Ohta H., Kawai H., Nakao M. (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, **274**, 336.
182. Scalera V., Huang Y. K., Hildmann B., Murer H. (1981). *Membr. Biochem.*, **4**, 49.
183. Roy D., Rosenfeld L., Spector A. (1982). *Exp. Eye Res.*, **35**, 113.
184. Graham J. M., Coffey K. H. M. (1979). *Biochem. J.*, **182**, 165.
185. Wisher M. H., Evans W. H. (1975). *Biochem. J.*, **146**, 375.
186. Inoue M., Kinne R., Trans T., Biempica L., Arias I. M. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 5183.
187. Nijjar M. S., Ho J. C. H. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 238.
188. Casale T. B., Friedman M., Parada N., Plekes J., Kaliner M. (1984). *J. Membr. Biol.*, **79**, 33.

189. Kaevar V., Szamel M., Goppelt M., Resch K. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **776**, 133.
190. Adams D. A., Freauff S. J., Erickson K. L. (1985). *Anal. Biochem.*, **144**, 228.
191. Truding R., Shelanski M. L., Daniels M. P., Morell P. (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 3973.
192. Record M., Laharrague P., Fillola G., Thomas J., Ribes G., Fontan P., Chap H., Corberand J., Douste-Blazy L. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **819**, 1.
193. O'Donnell R. T., Andersen B. R. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **814**, 307.
194. Chibber R., Castle A. G. (1983). *Eur. J. Biochem.*, **136**, 383.
195. Arvan P., Castle J. D. (1981). *J. Cell Biol.*, **95**, 8.
196. Boyd C. A. R., Chipperfield A. R., Steele L. W. (1979). *J. Dev. Physiol.*, **1**, 361.
197. Molitoris B. A., Simon F. R. (1985). *J. Membr. Biol.*, **83**, 207.
198. Truman P., Wakefield S. J., Ford H. C. (1981). *Biochem. J.*, **196**, 121.
199. Cole D. E. C. (1984). *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 223.
200. Khalfoun B., Degenne D., Arbeille-Brassart B., Gutman N., Bardos P. (1985). *FEBS Lett.*, **181**, 33.
201. Sixma J. J., Lips J. P. M. (1978). *Thrombos. Haemostas. (Stuttgart)*, **39**, 328.
202. Seiler S., Flesicher S. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 13862.
203. Daniel E. E., Grover S. K., Kwan C. Y. (1982). *Fed. Proc.*, **41**, 2898.
204. Ljungstrom M., Norberg L., Olafsson H., Wernstedt C., Vega F. V., Arvidson G., Mardh S. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 209.
205. Millette C. F., O'Brien D. A., Moulding C. T. (1980). *J. Cell Sci.*, **43**, 279.
206. Schneider D., Brauer D., Falke D. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **685**, 94.
207. Haeffner E. W., Kolbe K., Schroeter D., Paweletz N. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **603**, 36.
208. Franke W. W., Kapprell H. P., Mueller H. (1983). *Eur. J. Cell Biol.*, **32**, 117.
209. Kensler R. W., Goodenough D. A. (1980). *J. Cell Biol.*, **86**, 755.
210. Stevenson B. R., Goodenough D. A. (1984). *J. Cell Biol.*, **98**, 1209.
211. Carlin R. K., Grab D. J., Cohen R. S., Siekevitz P. (1980). *J. Cell Biol.*, **86**, 831.
212. Somerville R. A., Merz P. A., Carp R. I. (1984). *J. Neurochem.*, **43**, 184.
213. Mitchell R. D., Palade P., Fleischer S. (1983). *J. Cell Biol.*, **96**, 1008.
214. Yoshinari M., Taurog A., Krupp P. P. (1985). *Endocrinology*, **117**, 580.
215. Glaumann H., Ahlberg J., Berkenstam A., Henell F. (1986). *Exp. Cell Res.*, **163**, 151.
216. Montague D. J., Peters T. J., Baum H. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 9.
217. Burnette B., Batra P. P. (1985). *Anal. Biochem.*, **145**, 80.
218. Batra S. (1982). *Acta Physiol. Scand.*, **114**, 91.
219. Warley A., Cook G. M. W. (1976). *Biochem. J.*, **156**, 245.
220. Hutton J. C., Penn E. J., Peshavaria M. (1982). *Diabetologia*, **23**, 365.
221. Cameron R. S., Castle J. D. (1984). *J. Membr. Biol.*, **79**, 127.
222. Fricker L. D., Snyder S. N. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3886.
223. Fishman J. B., Fine R. E. (1987). *Cell*, **48**, 157.
224. Willems M. F., De-Potter W. P. (1983). *J. Neurochem.*, **41**, 466.
225. Gordon-Weeks P. R., Lockerbie R. O. (1984). *Neuroscience*, **13**, 119.
226. Hook G. E. R., Gilmore L. B. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 9211.
227. Gonatas J. O., Gonatas N. K., Stieber A., Fleischer B. (1985). *J. Neurochem.*, **45**, 497.

МЕМБРАННЫЕ ФРАКЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

*Д. Джеймс Моррэ, Эндрю О'Брайтман,
Анна Стина Санделиус*

1. Введение

В этой главе представлен обзор методов выделения мембран растительных клеток и обсуждены возникающие при этом проблемы. Получение изолированных мембран имеет решающее значение для создания бесклеточных систем, без которых немислим прогресс в исследовании сложных физиологических и биохимических феноменов [1].

Особое внимание уделено новым разработкам, в первую очередь выделению плазматических мембран с помощью распределения в двухфазной системе, а также выделению плазматических мембран и тонопластов из одного гомогената методом препаративного электрофореза в свободном потоке. Объем данных о ферментах-маркерах и критериях для оценки чистоты полученных фракций постоянно возрастает; составлены таблицы распределения активностей и описаны маркеры для различных мембранных фракций. В настоящее время уровень развития экспериментальных подходов к выделению очищенных мембранных фракций из растений близок к тому, что был достигнут ранее только для печени крысы [2].

Различия во фракционировании мембран растительных и животных клеток обусловлены тремя факторами.

1. Растительная клетка окружена целлюлозной оболочкой (стенкой). Эта стенка в принципе не создает особых помех при выделении мембран, но ее наличие совершенно необходимо учитывать при разработке методов гомогенизации растительных тканей или клеток растений в культуре. Способы гомогенизации должны быть, с одной стороны, достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, а с другой — достаточно мягкими, чтобы не повредить органеллы.

2. В центре большинства клеток растений находится крупная заполненная жидкостью вакуоль, ограниченная мембраной — тонопластом. Ее площадь примерно такая же, как и площадь плазматической мембраны. При разрушении вакуоли образуются маленькие везикулы, а основная масса вакуолярного

содержимого выходит в среду, в которой осуществляется гомогенизация; при этом происходит разбавление среды и снижение рН (если среда недостаточно забуферена). Часто в вакуолях содержатся танины в высокой концентрации или другие вторичные продукты, которые могут отрицательно влиять на белки и активность ферментов.

3. Пластиды образуют систему органелл, по объему равную или превосходящую митохондриальную. В зеленых тканях пластиды (хлоропласты) содержат хлорофилл. Пластиды незеленых частей растений (например, корней) хлорофилла не содержат, но сами они присутствуют в таких тканях в значительных количествах. В их состав может входить крахмал; это так называемые крахмальные пластиды, или амилопласты. Именно они ответственны за образование объемного крахмального осадка при центрифугировании гомогенатов корней или запасующих тканей.

Излюбленным источником материала для разнообразных экспериментов по изучению роста являются так называемые этиолированные растения, т. е. растения, выращенные полностью или частично в темноте. Пластиды (этиопласты), полученные из этиолированных растений, могут содержать крахмал и различные протилакоидные мембраны. Предшественники любого типа пластид на ранних стадиях развития обычно называются пропластидами или препластидами. До сих пор не было обнаружено активно развивающихся тканей высших растений или водорослей, не содержащих пластид. Их присутствие затрудняет фракционирование растительных тканей в меньшей (а возможно, и в большей) степени, чем присутствие митохондрий. Пластиды легко подвергаются фрагментации, а седиментационные свойства или плавающая плотность этих фрагментов отличаются от аналогичных характеристик интактных пластид.

Таким образом, фракционирование растительных клеток осложняется наличием трех дополнительных факторов: присутствием клеточной стенки, вакуолей и пластид. У растений вакуолярная система развита гораздо сильнее, чем у животных; в то же время лизосомы как таковые в растительных тканях вообще не обнаружены. Митохондрии, ядра, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, пероксисомы, липидные капли, окаймленные везикулы и секреторные гранулы — это органеллы, присутствующие как в животных, так и в растительных клетках (см. гл. 1). В связи с большей сложностью растительных объектов при всех процедурах выделения мембран из них необходимо учитывать наличие не только митохондрий, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и плазматических мембран, но и тонопласта и пластид. Ранее с таким учетом были проведены только отдельные исследования, поэтому во мно-

гих экспериментах использовались мембранные препараты без адекватной оценки их состава. Ясно, что подобная практика не может считаться допустимой.

2. Приготовление гомогената

Прежде чем приступить к гомогенизации, необходимо:

1) приготовить среду, в которую будет высвобождаться клеточное содержимое;

2) выбрать способ разрушения клеток;

3) выбрать первоначальные этапы очистки, необходимые для удаления клеточных стенок, их фрагментов и крупных обломков клеток.

Полученный в результате так называемый суммарный бесклеточный гомогенат используется для последующей очистки. Кроме того, он подвергается биохимическим исследованиям для составления таблиц распределения активностей и расчета их выхода.

2.1. Среда для гомогенизации

Состав сред, использующихся при выделении и очистке индивидуальных клеточных компонентов, мы приведем в следующих разделах. Обычно в эти среды входят осмотически активное вещество, буфер и агенты, предотвращающие деградацию мембран, такие, как декстран, альбумин, ингибиторы протеаз (классификацию см. в гл. 1) и протекторы сульфгидрильных групп. Для получения шероховатого эндоплазматического ретикулума необходимо присутствие в среде таких ионов, как Mg^{2+} . В некоторых случаях желательны наличие в среде одновалентных ионов натрия или калия либо и того и другого.

2.2. Методы гомогенизации

Один из возможных методов состоит в измельчении ткани с помощью механического резака, снабженного бритвенным лезвием [3]. Этот способ, вполне пригодный для аналитических целей, неприемлем для решения препаративных задач из-за слишком больших затрат времени. Можно использовать гомогенизатор Polytron (политрон) [4], действующий по принципу вращающихся ножиц. Скорость вращения гораздо ниже той, при которой возникают звуковые или кавитационные эффекты. Политрон прост в обращении, вся процедура занимает немного времени и дает воспроизводимые результаты. Выход мембран при этом больше, чем при использовании резака с бритвенным лезвием. К недостаткам метода относится образование большого

числа разных обломков, получающихся при интенсивном перемешивании гомогената уже после разрушения клеток. Гомогенизатор с бритвенным лезвием этого недостатка лишен. Для гомогенизации 10—20 г исходного материала его рекомендуется включать на 5 мин при частоте движений 50—60/с. С помощью политрона ткань обычно гомогенизируют в течение 2 мин при 3000—4000 об/мин. Можно использовать и ступку.

Отношение ткань/среда при гомогенизации должно быть достаточно высоким. Если применяется политрон, то вся среда для гомогенизации добавляется с самого начала. В случае гомогенизатора с бритвенным лезвием среда вносится постепенно. На одну часть ткани желательно брать одну часть среды (в/о); в любом случае это отношение не должно быть ниже 1 : 2, иначе ухудшится сохранность органелл.

Температуру во время гомогенизации обычно поддерживают около 4°C. Если буфер охлажден, то нет необходимости работать в холодной комнате. Как правило, температура гомогената не должна превышать 25°C.

2.3. Удаление клеточных стенок и крупных обломков

Чтобы освободиться от клеточных стенок, их фрагментов и крупных обломков клеток, применяют разные способы фильтрации; это предпочтительнее центрифугирования, поскольку некоторые фрагменты имеют тенденцию к флотации, а крупные компоненты (например, ядра) при центрифугировании теряются. Через один слой Miracloth (Chickopee Mills, New-York), пористой целлюлозной ткани, почти количественно проходят ядра, но задерживаются фрагменты клеточных стенок. Для фильтрации можно использовать и мелкую нейлоновую сетку. Перед фильтрованием гомогенат необходимо перемешать и размять плоским шпателем о стенки сосуда, чтобы выдавить содержимое разрушенных клеток. Как целлюлозный, так и/или нейлоновый фильтр следует отжать после фильтрования, чтобы собрать как можно больше жидкой фракции и получить больше мембранного препарата.

2.4. Стабилизация гомогената

Чтобы устранить эффекты, связанные с высвобождением содержимого вакуолей, в среду для гомогенизации необходимо добавить альбумин или готовить ее на предварительно отцентрифугированном кокосовом молоке [3]. Кокосовое молоко — это жидкий эндосперм кокосовых орехов; его очищают центрифугированием в течение 1—3 ч при 100 000 g. Полученный супернатант не содержит мембран, но вместе с ним во фракции попа-

дают низкомолекулярные белки или посторонние ферменты; тем не менее кокосовое молоко — недорогой и эффективный источник протоплазмы растений (рис. 2.2).

Для стабилизации структуры органелл и фиксации их морфологии можно добавить глутаровый альдегид (конечная концентрация 0,1%, о/о) либо к свежеприготовленному гомогенату [5, 6], либо на какой-либо стадии выделения. Препараты, стабилизированные глутаровым альдегидом, не разрушаются при дальнейшей очистке, однако их применение для определения ферментативной активности ограничено. Обычно в таких случаях для анализа результатов пользуются методом экстраполяции [7]. Химический анализ подобных препаратов возможен в тех случаях, когда несущественно наличие сшивок между амино-, SH- и гидроксильными группами (а именно — при определении общего содержания N или P), а также при исследовании кинетики включения изотопов *in vivo* [8, 9].

3. Основные подходы к разделению мембран

Суть выделения растительных мембран из гомогената состоит в концентрировании фракций органелл или клеточных компонентов. Задача исследователя заключается в получении фракций с хорошим выходом компонентов, в достаточном количестве, не загрязненных другими клеточными компонентами; при этом функциональное состояние мембран должно быть таким, чтобы возможно было их дальнейшее исследование. Для оптимального разделения можно основываться либо на каких-то отдельных свойствах, по которым различаются клеточные компоненты, либо на всех подобных свойствах. Как правило, это такие характеристики, как форма, размер, плотность, поверхностный заряд, химические и ферментативные свойства наружной поверхности мембраны, причем эти различия могут быть как природными, так и созданными искусственно. По-видимому, для полного фракционирования растительных клеток необходимо использовать совокупность методик и основываться на нескольких свойствах мембран.

Далее мы будем следовать рекомендациям, данным де Дювом [10]. Он предлагает называть любую организованную область цитоплазмы, состоящую из макромолекул разных типов, термином *клеточный компонент*, а не органелла. Термин «органелла», приемлемый для компонентов, ограниченных мембраной и представляющих собой отдельные образования (а именно — митохондрии, пластиды, ядра, пероксисомы), становится неоднозначным в современном употреблении. Для крупных протяженных клеточных структур, таких, как эндоплазматический ретикулум, плазматическая мембрана, тонопласт и аппарат Гольд-

жи, термин «клеточный компонент», по-видимому, будет более адекватным. Термин *химический компонент* обозначает индивидуальный тип молекул (т. е. липиды, белки, сахара, нуклеиновые кислоты), из которых состоят клеточные компоненты.

Термин *маркер* относится к такому химическому компоненту, природному или внесенному искусственно, который обнаруживается в основном в каком-то одном клеточном компоненте или его части и сохраняется, когда этот компонент выделяют и он лишается естественного окружения интактной клетки [11]. Предложенное де Дювом [12] определение содержит оговорку о том, что некоторые маркеры свойственны только клеточным компонентам определенных типов клеток или определенных видов растений или животных.

Далее мы кратко опишем принципы трех основных подходов к фракционированию растительных клеток. Сведения об их историческом развитии и о подробностях методик можно найти в работах, ссылки на которые приведены в описании каждой методики (см. также гл. 1).

3.1. Дифференциальное центрифугирование и центрифугирование в градиенте плотности

Центрифугирование широко используется для выделения мембран и клеточных компонентов. Поведение частиц при центрифугировании определяется двумя основными параметрами: скоростью седиментации (s) и плотностью (ρ). Андерсон разработал концепцию s — ρ -пространства [13], в котором может происходить разделение органелл по их размеру (скорость седиментации) или плотности либо и по тому, и по другому параметрам одновременно (рис. 1.2). Органеллы и клеточные компоненты с одинаковыми размерами и плотностью нельзя разделить с применением только разных способов центрифугирования. Практически для достижения эффективного разделения мембранных клеточных компонентов используют три типа центрифугирования.

3.1.1. Дифференциальное центрифугирование

При дифференциальном центрифугировании первыми осаждаются клеточные компоненты с наибольшей массой (т. е. целые клетки и ядра), а последними — с наименьшей (т. е. микровезикулы). Получающийся осадок может состоять из нескольких слоев (когда для выделения более чем одного клеточного компонента соответствующим образом увеличивают или время, и/или скорость центрифугирования) либо содержать только один слой (время и скорость подобраны таким образом, чтобы

Таблица 2.1. Режим центрифугирования, использующийся для осаждения клеточных компонентов растений¹⁾

Клеточный компонент	$g_{\text{так}}$	Время, мин	$g \cdot \text{мин}$
Целые клетки	500	5	2500
Ядра	500	7	3500
Хлоропласты	2000	2	4000
Митохондрии	6000	15	90 000
Аппарат Гольджи (диктиосомы)	10 000	20	200 000
Плазматическая мембрана — везикулы тонопласта	16 000	20	320 000
Пероксисомы	17 500	20	350 000
Везикулы эндоплазматического ретикулаума (микросомы)	17 500	20	350 000
Окаймленные везикулы (микровезикулы)	20 000	20	400 000

¹⁾ Приведенные значения приблизительны и относятся к клеточным компонентам, суспендированным в 0,25 М растворе сахарозы и центрифугируемым в стандартных пробирках (длина пути по вертикали 9 см).

седиментировал только один компонент). Режим центрифугирования представляют в виде записи

Центробежное ускорение · время ($g \cdot \text{мин}$).

В табл. 2.1 даны примерные значения этих параметров, необходимые для осаждения различных клеточных компонентов.

Разделение мембран путем дифференциального центрифугирования суммарного гомогената никогда не бывает полным. Так называемые ядерные митохондриальные и микросомные фракции, о которых шла речь в ранних прописях, представляли собой в лучшем случае грубые смеси. Тем не менее дифференциальное центрифугирование позволяет получать, с одной стороны, частично обогащенные фракции, которые впоследствии можно разделить другими методами, а с другой — конечный продукт при разделении смесей, приготовленных с помощью других методик, например электрофореза в свободном потоке. При получении частично обогащенных фракций необходимо позаботиться о том, чтобы осадок не был слишком плотным. Для этого можно использовать центрифугирование на сахарозной подложке, или «мини-градиент» (рис. 2.8).

3.1.2. Центрифугирование в градиенте плотности

Для создания градиента плотности обычно используют сахарозу, хотя в некоторых случаях применяют другие вещества — ренографин, фиколл, перколл и метризамид (см. также гл. 1).

Концентрации их выражают в процентах, молях или единицах плотности (в последнем случае указывают температуру) (см. Приложение I). В случае сахарозного градиента наиболее удобной величиной является молярность. Градиенты могут быть непрерывными (линейными или нелинейными) и ступенчатыми. Ступенчатый градиент наиболее предпочтителен при препаративном фракционировании клеток, поскольку его легко готовить и он обеспечивает воспроизводимое получение мембранных фракций с хорошими чистотой и выходом. Градиенты, особенно ступенчатый, не нужно центрифугировать для уравнивания.

Чтобы ускорить получение препарата и обеспечить максимальную сохранность структур и функциональной активности, мембранные препараты обычно центрифугируют не менее 30 мин. На рис. 2.1 показан результат разделения растительного гомогената в непрерывном градиенте, а на рис. 2.2 — ступенчатый градиент для препаративных исследований, приготовленный на основе полученных с помощью непрерывного градиента данных.

Стандартные методики с применением градиента плотности сахарозы (см., например, работу [15]) оказываются наиболее полезными при проведении опытов по идентификации различных мембран, но имеют ограниченную ценность как препаративные методы из-за перегрузки градиента загрязняющими препарат мембранами.

3.1.3. Зонально-скоростное центрифугирование

Зонально-скоростное центрифугирование состоит в том, что мембраны центрифугируют в среде с определенной плотностью или плотностями для того, чтобы замедлить осаждение какого-то одного клеточного компонента относительно других и, следовательно, увеличить эффективность дифференциального центрифугирования. В качестве примера можно рассмотреть отделение поверхностных мембран от митохондриальных из фракции D в градиенте, представленном на рис. 2.2. При наложении этой фракции на 1,25 М раствор сахарозы и центрифугировании в течение 10 мин при 10 000 g митохондрии осаждаются, а поверхностные мембраны остаются в супернатанте. Последние затем разбавляют буфером в отношении 1:1 и собирают с помощью дифференциального центрифугирования.

3.2. Распределение в водных двухфазных системах

Эта методика основана на использовании смеси растворов двух полимеров, которая самопроизвольно разделяется на две фазы. Этот подход был разработан Албертсоном [16, 17] и использует поверхностные свойства мембран. Так, мембраны раз-

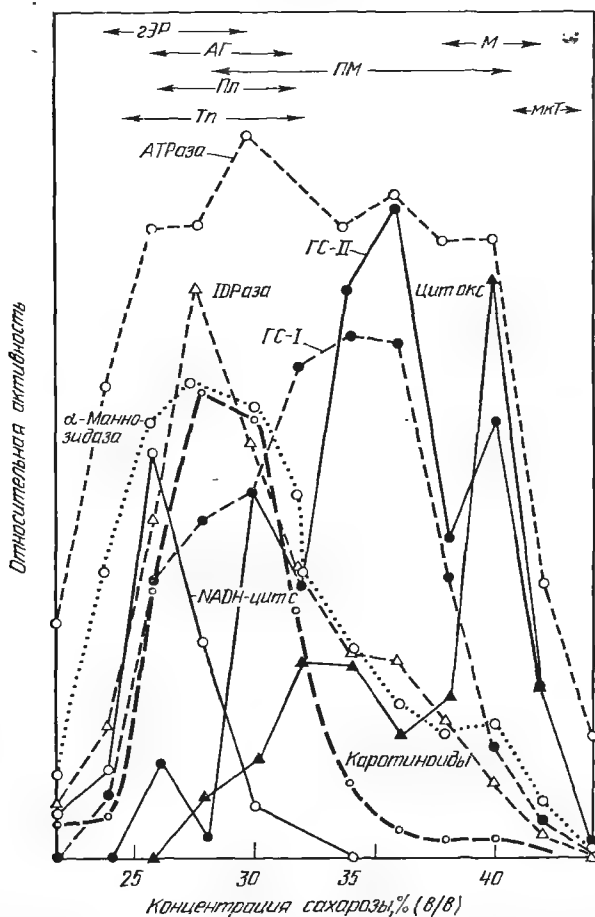


Рис. 2.1. Разделение суммарного гомогената этиолированных гипокотилей тыквы (*Cucurbita pepo*) в непрерывном градиенте плотности сахарозы. Этот рисунок в полной мере иллюстрирует относительную сложность фракционирования растительного гомогената. Сначала освобождаются от крупных частиц путем фильтрования через нейлоновую ткань и центрифугирования при 4000 g в течение 10 мин. Ферментами-маркерами и характерными химическими компонентами являются α -маннозидаза для тонопласта (Тп), NADH-цитохром с — редуктаза (NADH-цит. с) для гладкого эндоплазматического ретикулума (гЭР), глюкансинтетаза I (ГС-I) и IDРаза (нуклеотиддифосфатаза, субстрат IDP) для аппарата Гольджи (АГ), глюкансинтетаза II (ГС-II) для плазматической мембраны (ПМ), каротиноиды для пластид (Пл) и цитохромоксидаза (цит. окс.) для митохондрий (М). Пероксисомы или микротельца (мкТ), по-видимому, располагаются справа от митохондрий. (Из работы [14] с изменениями; оригинальные данные любезно предоставлены Dr. G. F. E. Scherer, Botanical Institute, University of Bonn, FRG.)

ных клеточных компонентов (а возможно, и мембраны одного компонента, но из разных источников) могут иметь неодинаковый поверхностный заряд. Сначала подбирают условия распределения, варьируя полимеры и солевой состав среды. Очень важно тщательно готовить растворы полимеров, поскольку их свойства могут изменяться от партии к партии. В связи с этим исходные растворы полимеров проверяют каждый раз после их очистки (см. также гл. 1).

Процедура разделения состоит в том, что фазовую систему, содержащую мембраны, перемешивают встряхиванием 20—40 раз, а затем центрифугируют непродолжительное время при

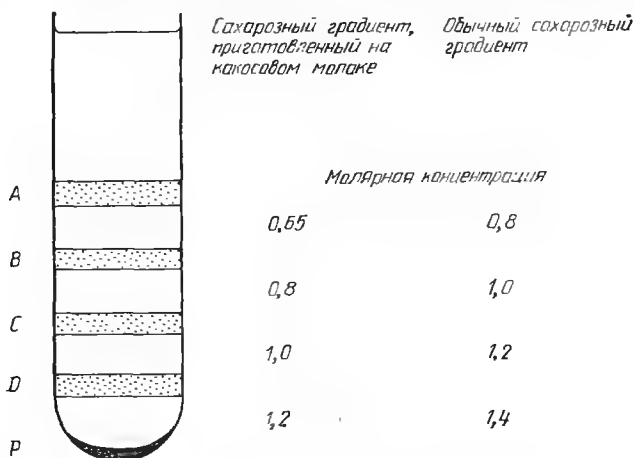


Рис. 2.2. Обычный ступенчатый градиент сахарозы и градиент сахарозы, приготовленный на кокосовом молоке, используемые для разделения клеточных компонентов гомогената сои. В кокосовом молоке содержатся растительные белки, которые способствуют стабилизации мембран и ферментов. По своим осмотическим свойствам кокосовое молоко эквивалентно 0,2 М сахарозе.

4 °С на малой скорости в бакет-ротаторе с подвесными стаканами, в результате чего полимеры разделяются на две фазы (рис. 2.3). Мембраны, сконцентрировавшиеся в разных фазах, либо еще раз подвергают распределению, либо отмывают для дальнейшей очистки, либо собирают окончательно.

3.3. Препаративный электрофорез в свободном потоке

Этот метод разработан Хэннигом и др. [19]. Смесь компонентов, подлежащую разделению, вносят тонкой струйкой в разделяющий буфер, который движется перпендикулярно наложенному электрическому полю (см. также гл. 1). Мембраны с

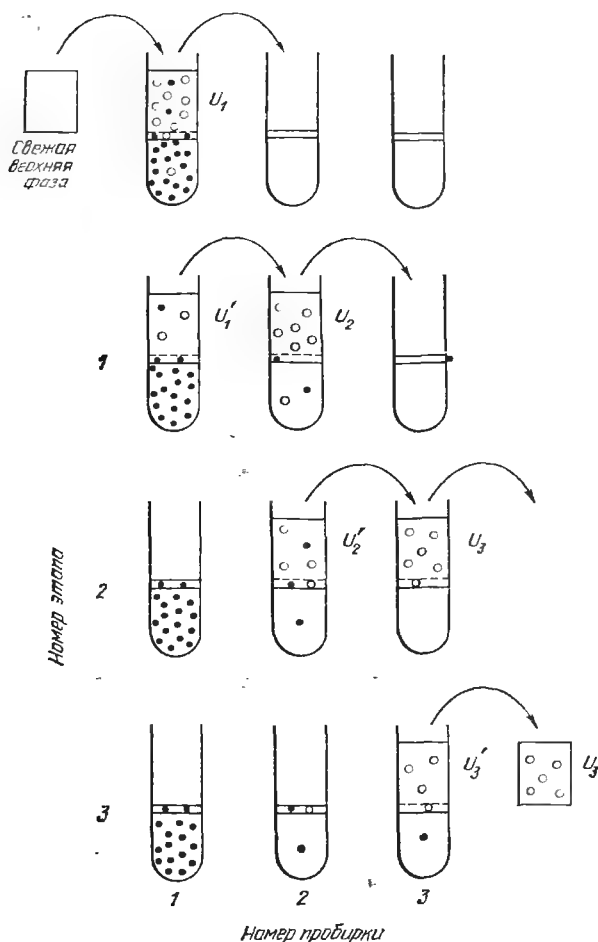


Рис. 2.3. Очистка плазматических мембран с помощью распределения в водной двухфазной системе. Суспензию плазматических (светлые кружки) и других (темные кружки) мембран вносят в приготовленную смесь растворов полимеров, чтобы получить фазовую систему нужного состава. Содержимое пробирок хорошо перемешивают переворачиванием (40 раз) и оставляют уравниваться. Разделение двух фаз ускоряют с помощью низкоскоростного центрифугирования в бакет-роторе с подвесными стаканами. Затем 90% верхней фазы (U_1) удаляют (до уровня, соответствующего пунктирной линии) и дважды повторяют перераспределение со свежей нижней фазой (этапы 1 и 2) для дальнейшей очистки; при этом получают фракцию U_3 . Чтобы увеличить выход плазматических мембран, можно повторить экстракцию нижних фаз со свежей верхней фазой (этапы 1—3) и получить фракцию U_3' . Свежие верхнюю и нижнюю фазы получают из исходных растворов для фазовой системы, приготовленных отдельно. Подробности см. в разд. 7.2. (Из работы [18].)

разным поверхностным зарядом, перемещаясь с буфером, отклоняются от направления движения буфера в ячейке неодинаковым образом и разделяются (рис. 2.4). Недавно с помощью этой методики удалось выделить плазматические мембраны и тонопласты непосредственно из гомогената как этиолированных стеблей [21], так и зеленых листьев [22]. Кроме того, были раз-

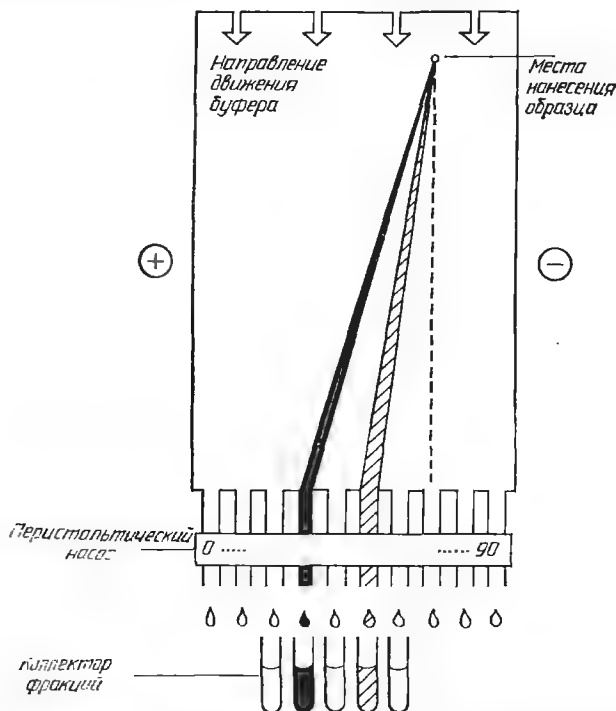


Рис. 2.4. Принципиальная схема препаративного непрерывного электрофореза в свободном потоке. Перерисовано и печатается с разрешения фирмы Bender and Hobein, Munich (Из работы [20].)

делены митохондрии и эндоплазматический ретикулум [23]. Последнее имеет большое значение, поскольку митохондрии часто загрязняют фракции эндоплазматического ретикулула.

4. Идентификация клеточного компонента и критерии его очистки

Идентификация выделенного клеточного компонента (ов) является одной из важнейших задач при фракционировании. Для ее решения можно использовать биохимические маркеры или

характерные морфологические свойства компонентов. Как правило, желательно сочетание обоих способов. При идентификации прежде всего важна корреляция признаков выделенного клеточного компонента и компонента, локализованного в интактной клетке. Компонент, содержащий латентную кислую фосфатазу, сначала был выделен из животных клеток, а позднее идентифицирован методом цитохимии: было показано, что этот фермент ассоциирован с морфологически выявляемыми лизосомами. В случае аппарата Гольджи применялась обратная стратегия. Исходно его фрагменты были идентифицированы по их характерной морфологии (стопки цистерн — диктиосомы) [24, 25], и лишь затем была установлена корреляция в локализации специфических гликозилтрансфераз [26—29]. В табл. 2.2 перечислены некоторые критерии для идентификации клеточных компонентов.

Параметром, особенно важным для идентификации поверхностных мембран (плазматическая мембрана и тонопласт), является толщина мембраны, измеренная с помощью электронной микроскопии (табл. 2.3, рис. 2.5). Тонопласт, плазматическая мембрана, а также некоторые мембраны зрелого аппарата Гольджи имеют большую толщину (7—10 нм). По способности связывать фосфовольфрамовую кислоту (ФВК) при низких pH такие мембраны можно разделить на два класса: это связывающие ее плазматические мембраны и несвязывающие мембраны тонопласта. Все остальные мембраны тонкие (5—6 нм) и не связывают ФВК при низких pH. Таким образом, электронная микроскопия контрастированных препаратов при увеличении до 1 000 000 позволяет идентифицировать упомянутые классы мембран.

О наличии соответствующего биохимического маркера судят по одному из двух критериев (или по обоим вместе). Во-первых, чистая фракция исследуемого клеточного компонента должна иметь наибольшую удельную активность. Если используется абсолютный маркер (см. ниже), то анализ выхода активности и ее распределение по фракциям должны указывать на то, что вся маркерная активность или большая ее часть ассоциирована с исследуемой фракцией. Во-вторых, в последовательности фракций с увеличивающимся содержанием маркера и данного клеточного компонента должна наблюдаться корреляция между этими двумя величинами (рис. 2.6).

Химические компоненты, обнаруживающие корреляцию с количеством какого-то определенного клеточного компонента, называют маркерами. Это могут быть *абсолютные маркеры* (они присутствуют *только* в конкретных клеточных компонентах; например компоненты электронтранспортной цепи митохондрий и хлоропластов или хлорофилл, присутствующий только хлоропластам)

Таблица 2.2. Клеточные компоненты растений и характеристики, позволяющие идентифицировать их одновременно в изолированном состоянии и *in situ*

Клеточный компонент	Характеристика мембраны	Биохимическая характеристика	Ссылка
Плазматическая мембрана	Мембраны большой толщины (~10 нм); связывают ФВК при низких pH	Связывание N-1-нафтилфталамовой кислоты	[30] [31]
Тонопласт	Мембраны большой толщины (~7—9 нм); не связывают ФВК при низких pH	АТРАЗная активность, стимулируемая анионами и ингибируемая нитратами	[21, 22, 32, 33]
Митохондрии	Тонкие (~6 нм) мембраны. Кристы с электронтранспортной активностью	Сукцинатдегидрогеназная, цитохромоксидазная и другие виды активности, характерные для митохондрий	[34, 35]
Хлоропласты	Тонкие (~6 нм) мембраны. Тилакоиды	Содержат хлорофилл	[36, 34]
Амилопласты	Тонкие (~6 нм) мембраны. Взаимодействуют с KMnO_4	Моногалактозилдиглицеролсинтазная активность. Содержат каротиноиды. Содержат дигалактозил- и моногалактозилдиглицеролы	[37] [38]
Аппарат Гольджи	И толстые, и тонкие мембраны; цистерны организованы в стопки	Активность латентной IDРАЗы как в выделенном препарате, так и определяемая <i>in situ</i> цитохимически	[5, 24, 26, 39]
Эндоплазматический ретикулум	Тонкие мембраны (6 нм) с присоединенными рибосомами	Активность NADPH-цитохром с — редуктазы (NADH-цитохром с — редуктазы)	[35]
Пероксисомы	Одинарная ограничивающая мембрана. Электроноплотное содержимое	Активность каталазы и различных ферментов, катализирующих образование H_2O_2	[40]
Ядра	Тонкие (6 нм) мембраны; две мембраны соединены порами, с внутренней ассоциирован хроматин	Содержится ДНК	[41]
Окаймленные везикулы	Клатринный покров	Обнаруживается клатрин при электрофорезе в ПААГ с ДСН (180—190 кПа)	[42, 43, 44, 208]

Таблица 2.3. Характерная толщина мембран, позволяющая идентифицировать их в выделенных фракциях

Клеточный компонент	Толщина мембраны, нм±стандартное отклонение				
	гипокотили сои [21]	листья шпината [22]	стебли лука ¹⁾	<i>Pythium aphanidermatum</i> [33]	
				in situ	выделенные
Плазматическая мембрана	10,1±0,7	10,5±0,3	9,3	9,2±0,4	9,6±0,45
Мембрана тонопласта	7,2±0,8	8,1±0,9	8,0	9,3±0,5	9,7±0,45
Эндоплазматический ретикулум	5,7±0,7	6,3±0,8	5,3	6,0±0,1	6,0±0,1
Ядерная оболочка					
наружная мембрана	5,8±0,8	6,8±0,6			
внутренняя мембрана	6,5±0,6	5,8±0,7			
среднее для обеих мембран			5,6	6,1±0,5	6,1±0,45
Митохондрии					
наружная мембрана	5,0±0,6	6,4±0,8	5,5	6,0±0,2	6,4±0,3
внутренняя мембрана	6,2±0,7	6,0±0,9	6,0	6,2±0,2	6,2±0,4
Этиопласт					
наружная мембрана	5,0±0,6				
оболочки					
внутренняя мембрана	6,1±0,8				
оболочки					
тилакоид	8,0±1,0				
Хлоропласт					
наружная мембрана		5,1±0,8			
оболочки					
внутренняя мембрана		6,3±0,8			
оболочки					
грана тилакоида ²⁾		13,0±1,1			
Пероксисома	5,5±0,6	7,0±0,4			
Аппарат Гольджи	6—9	6,6±1,8	5—9	7—9 ³⁾	7—9 ³⁾

¹⁾ Неопубликованные данные. Фиксация глутаральдегидом—четыреокисью осмия.

²⁾ Обе прижатые мембраны вместе.

³⁾ Эквивалент аппарата Гольджи. Включает секреторные везикулы.

или *условные* (их концентрация наиболее высока в каком-то определенном клеточном компоненте, но в меньшем количестве они присутствуют и в других компонентах); примером может служить глюкансинтетаза II, которая концентрируется в основном в плазматической мембране, но содержится также в аппарате Гольджи. Ценность маркеров состоит не только в том, что они позволяют идентифицировать интересующие исследователя клеточные компоненты, но и в том, что с их помощью можно определить чистоту препарата, оценив качественно или количественно содержание примесей. Для количественной оценки определяют удельную активность ферментов-маркеров в чистых

фракциях либо прямыми измерениями, либо путем экстраполяции. Примеры данных такого рода для фракций, выделенных из этиолированных гипокотилей сои, приведены в табл. 2.4. Полный список маркеров для компонентов растительной клетки дан в обзорах [34, 52].

Для идентификации и определения чистоты фракции необходимо провести анализ с использованием как минимум двух независимых маркеров для данного компонента (например, в случае плазматической мембраны необходимо определить активность глюкансинтетазы II и проверить связывание ФВК при низких pH; используя морфометрию, последний критерий можно перевести на количественную основу). Кроме того, необходимо

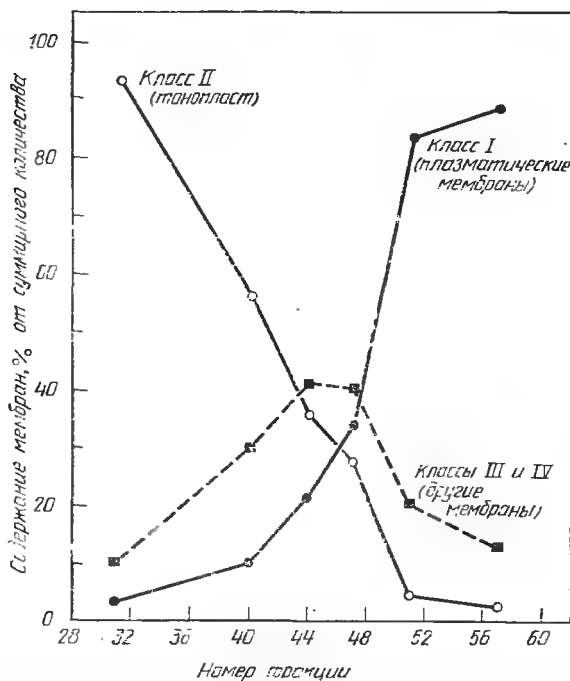


Рис. 2.5. Распределение мембран классов I (плазматическая мембрана), II (тканопласт) и III (другие мембраны) при электрофорезе в свободном потоке (зеленые листья шпината) [23]. Исходная фракция представляла собой осадок микросом, из которого с помощью дифференциального центрифугирования были удалены митохондрии и хлоропласты. Классификация мембран основана на измерении их толщины на электронных микрофотографиях. Класс I — толстые мембраны (7—11 нм), связывающие ФВК при низких pH [31]; класс II — толстые мембраны (7—11 нм), не связывающие ФВК при низких pH; класс III — тонкие мембраны (5—7 нм), не связывающие ФВК при низких pH; класс IV — очень толстые мембраны (12—14 нм), состоящие из прижатых мембран тилакоидных гран.

иметь репрезентативные электронные микрофотографии данной фракции и сводную таблицу удельных активностей каждого из маркеров, указанных в табл. 2.4 или аналогичных им, которые охватывали бы все основные клеточные компоненты гомогената. Помимо обычно определяемых активностей маркеров для митохондрий, эндоплазматического ретикулума, плазматической мембраны и аппарата Гольджи, нужно оценить активности маркеров для тонопласта и пластид. Следует также учесть наличие пероксисом, хотя содержание их невелико (разд. 13). Получе-

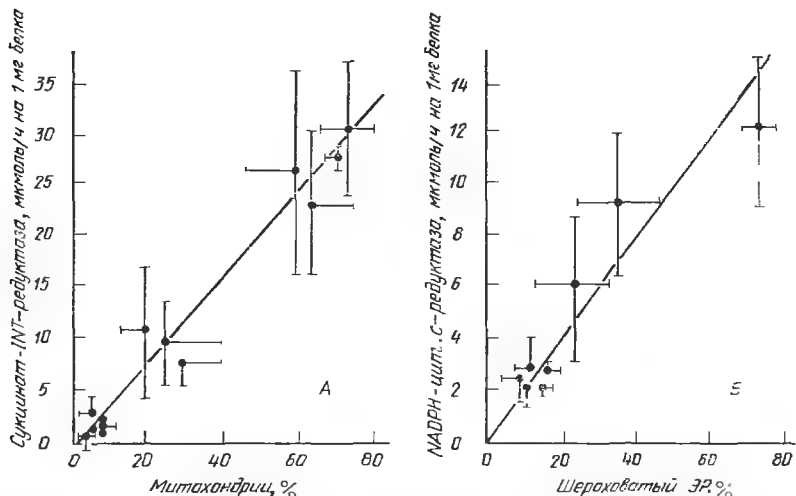


Рис. 2.6. Связь между удельной ферментативной активностью и составом мембранных фракций, выделенных из сои в сахарозном градиенте [23]. А. Сукцинат-INT-редуктаза и митохондрии. Б. NADPH-цитохром *c* — редуктаза и шероховатый эндоплазматический ретикулум. Мембранный состав фракций определен морфометрически.

ние всех указанных оценок часто затрудняется неспецифическим распределением каталазы в клетках растений. Электронно-микроскопические данные должны быть представлены в количественном виде; кроме того, сами фотографии должны быть высокого качества, чтобы можно было установить не столько чистоту фракции, сколько морфологические характеристики, на которых основывается идентификация.

Для количественного представления электронно-микроскопических данных рекомендуется следующий простой метод, описанный впервые в работе [53] и использованный впоследствии для анализа выделенных фракций [54].

1. Изготавливают прозрачный трафарет, расчерченный параллельными прямыми, отстоящими друг от друга на 1 см.

Таблица 2.4. Ферменты-маркеры для клеточных компонентов из этиолированных гипокотилей сои

Клеточный компонент	Фермент-маркер	Удельная активность ¹⁾	Единицы	Ссылки ²⁾
Эндоплазматический ретикулум ³⁾	NADPH-цитохром с — редуктаза	15,3	Мкмоль восстановленного цит. с/ч на 1 мг белка	[35, 45]
Аппарат Гольджи ⁴⁾	Латентная IDPaза (pH 7,2)	47	мкмоль P/ч на 1 мг белка	[39, 46]
Плазматическая мембрана	Глюкансинтетаза II (1 мМ UDPG)	585	нмоль включенной [¹⁴ C]-глюкозы/ч на 1 мг белка	[46, 47]
Тонoplast	АТРаза, ингибируемая NO ₃ ⁻ и стимулируемая Cl ⁻	0,55	мкмоль/ч на 1 мг белка	[21, 48]
Митохондрии ⁵⁾	Сукцинат-INT-редуктаза	37,5	мкмоль восстановленного INT/ч на 1 мг белка	[35, 49]
Этиопласты ⁶⁾	Каротиноиды	80	нг на 1 мг белка	[38]
Пероксисомы	Каталаза	—	—	40

¹⁾ Приведены значения для очищенных фракций, полученные расчетным путем с помощью регрессионного анализа фракций с известным содержанием органелл, установленным независимо с помощью морфометрии.

²⁾ В первой из указанных работ описан способ регистрации, а во второй приведены данные об удельной активности. Подробности см. в работе [50].

³⁾ Включая ядерную оболочку.

⁴⁾ В качестве альтернативы можно использовать глюкансинтетазу I (1,5 мМ UDPG) с удельной активностью 0,2 нмоль включенной [¹⁴C]-глюкозы из UDP-[¹⁴C]-глюкозы в целочисленнорастворимый глюкан за 1 ч на 1 мг белка [46, 47].

⁵⁾ Наряду с некоторыми другими ферментами можно использовать цитохромоксидазу с удельной активностью 1,13 мкмоль O₂/мин на 1 мг белка [50, 51].

⁶⁾ Можно определять также содержание моногалактозил- и дигалактозилдиглицеридов; их содержание превышает 1 мг на 1 мг фосфолипида [38].

2. Анализируют микрофотографии препаратов при увеличении примерно 35 000. Подсчитывают число пересечений всех мембран с линиями наложенного трафарета, а затем — число пересечений для мембран отдельных клеточных компонентов.

3. Представляют результаты в виде числа пересечений мембран конкретного компонента, отнесенного к 100 пересечениям с суммарными мембранами.

5. Распределение маркеров и их выход

Составление таблиц распределения маркеров и их выхода совершенно необходимо для того, чтобы установить, насколько обоснованно применение того или иного маркера, какова их специфичность, а также насколько велика эффективность выделения. Используя в качестве маркера какой-то определенный химический компонент или ферментативную активность, во-первых, измеряют объем исходного гомогената и каждой получен-

ной после выделения ресуспендированной фракции и, во-вторых, определяют содержание белка и активность маркера в аликвотах каждой из фракций. Эти данные используют для расчета удельной активности, которая используется впоследствии для определения абсолютного выхода активности. Суммарная активность в каждой фракции должна примерно соответствовать содержанию клеточного компонента в суммарном гомогенате. Отклонение ее более чем на 10—20% указывает на ошибку в определении или на возможную активацию или инактивацию фермента.

Чтобы определить суммарный выход активности, необходимо связать состав выделенных фракций и интактной клетки.

1. Реконструируют целую клетку по электронным микрофотографиям срединных срезов определенного числа хорошо зафиксированных клеток. Если растительные клетки содержат вакуоли, необходимо просмотреть по крайней мере 10 клеток. Микрофотография только одной, даже случайно выбранной клетки может дать искаженное представление.

2. Используя метод пересечений [53] (см. выше), оценивают относительное содержание каждого клеточного компонента:

$$\frac{\text{Число пересечений с конкретным компонентом}}{100 \text{ пересечений с суммарным мембранным препаратом}} (\% \text{ от суммарного количества мембран})$$

3. Связывают эти данные с содержанием белка, приготовив гомогенат, в котором разрушено более 90% клеток; убеждаются, что выход органелл достаточен для определения суммарного белка.

4. Центрифугируют гомогенат при 100 000 g в течение 90 мин, чтобы получить суммарный препарат мембран.

5. Определяют суммарное содержание белка и относят его к исходному сырому весу ткани. Из этих данных можно получить содержание белка в миллиграммах на единицу сырого веса ткани для каждого клеточного компонента, как это показано в сводной табл. 2.5 на примере мембран из этиолированных гипокотилей сои.

6. Определяют выход активности следующим образом. Оценивают удельную активность (ед./ед. белка) для данного маркера в суммарном гомогенате и в очищенной фракции. Сильно обогащенные фракции считают чистыми либо оценивают степень их очистки, используя какой-либо маркер. Чтобы получить суммарную активность, надо умножить удельную активность в гомогенате на содержание в нем белка. Для расчета доли суммарной активности во фракции какого-либо клеточного компонента умножают удельную активность маркера для этой

Таблица 2.5. Содержание клеточных компонентов в кортикальной цитоплазме этилированного гипокотыля сои, определенное морфометрически [50]

Клеточный компонент	Доля суммарного количества мембран, %	Содержание белка, мг на 10 г сырого веса
Ядерная оболочка	3,9	0,6
Эндоплазматический ретикулум	30,6	4,5
Аппарат Гольджи	12,3	1,8
Плазматическая мембрана	13,1	1,9
Тонoplast	10,3	1,5
Митохондрии	17,2	2,5
Этиопласты	12,2	1,8
Микротельца	0,2	0,03
Супернатант	—	37,4
Суммарный гомогенат	—	52,0

фракции на количество белка, приходящегося на этот компонент в клетке, и делят эту величину на степень очистки фракции. Если полученные цифры для суммарного гомогената и для клеточного компонента совпадают, то данный фермент можно считать абсолютным маркером для этого клеточного компонента.

Пример. Удельная активность сукцинат: 2-*n*-иодофенил-3-*n*-нитрофенил-5-фенил-2Н-тетразолийхлорид (сукцинат-INT) — редуктазы в гомогенате из сои равна 2,1 мкмоль восстановленного INT на 1 мг белка за 1 ч. Содержание суммарного белка в этом гомогенате равно 52 мг на 10 г сырого веса ткани (табл. 2.5). Суммарная активность гомогената составляет $52 \cdot 2,1 = 109,2$ мкмоль восстановленного INT на 10 г сырого веса за 1 ч. Удельная активность очищенных митохондрий равна 37,5 мкмоль восстановленного INT на 1 мг белка за 1 ч (табл. 2.4). При содержании белка в митохондриях 2,5 мг на 10 г сырого веса ткани (табл. 2.5) и чистоте фракции 90% получаем выход $37,5 \cdot 2,5 / 0,9 = 104,2$ мкмоль на 10 г сырого веса за 1 ч. Суммарная активность в гомогенате (109 мкмоль на 10 г сырого веса за 1 ч) и активность для митохондриальной фракции (104 мкмоль на 10 г сырого веса за 1 ч) достаточно близки, чтобы данный фермент можно было считать абсолютным маркером для митохондрий.

Аналогичные расчеты проведены для соевых бобов [50] и печени крысы [56].

6. Морфология и морфометрия

Для полной характеристики любой мембранной фракции, выделенной из клеток, следует, помимо всего прочего, провести электронно-микроскопические исследования. Иногда может ока-

заться полезной и световая микроскопия (например, для контроля за деструкцией клеток и/или ядер).

Основная задача электронно-микроскопических исследований состоит в контроле состава фракций путем прямого наблюдения и в количественном определении состава мембран выделенных фракций. Для этого необходимо обеспечить хорошую сохранность морфологии структур, чтобы можно было идентифицировать большинство мембран. Идентификация может быть основана на характерном внешнем виде клеточного компонента (ядра, диктиосомы, шероховатый эндоплазматический ретикулум, пероксисомы, митохондрии, пластиды), толщине мембраны и дифференциальном контрастировании с помощью ФВК при низких рН (тонопласт, плазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум без рибосом) (разд. 4) или цитохимической локализации какой-либо ферментативной активности (например, латентной инозиндифосфатазы для аппарата Гольджи).

Чтобы эти количественные характеристики были достоверны, необходимо обеспечить репрезентативность исследуемого препарата. Если образец гомогенен, достаточно взять пробу из любого места случайным образом. Если же осадок имеет слоистую структуру, то необходимо взять несколько проб по всей толщине осадка вдоль оси центрифугирования.

6.1. Фиксация

При фиксации мембран растительных клеток воспроизводимые результаты дает обработка глutarовым альдегидом (1—2,5%) в фосфатном буфере (0,1 М) при рН 7,2 в течение часа или более и дальнейшая фиксация 1%-ным раствором четырехокиси осмия в течение одного часа или в течение ночи в том же буфере. Образцы можно хранить в растворе глutarового альдегида как угодно долго, и в любой момент продолжить процедуру фиксации. При контрастировании препаратов с помощью ФВК при низких рН лучше проводить дегидратацию в ацетоне, а не в этаноле, а время выдерживания в растворах уменьшить до 5 мин. Удовлетворительные результаты дает заключение материала в эпон [57]. Отметим, однако, что заключение в эпон [58] может создавать помехи при контрастировании плазматических мембран с помощью ФВК при низких рН.

6.2. Негативное контрастирование

При морфологическом анализе можно использовать также негативное контрастирование.

1. Смешивают каплю образца, суспендированного в дистиллированной воде или в разбавленном буфере (присутствие боль-

ших количеств солей или сахарозы мешают анализу), с каплей 1%-ной ФВК, pH которой доведен до 7,0 гидроокисью калия. Смешивание проводят непосредственно на сеточке для электронной микроскопии с углеродным напылением, покрытой коллодием.

2. После перемешивания удаляют избыток жидкости с помощью пастеровской пипетки или капилляра либо фильтровальной бумаги.

3. Подсушенный таким образом препарат немедленно просматривают под электронным микроскопом.

Мембраны растительного происхождения можно стабилизировать, добавив раствор глутарового альдегида до приготовления препарата для электронной микроскопии.

Преимущество негативного контрастирования состоит в том, что мы очень быстро получаем необходимую информацию. Это позволяет контролировать процесс очистки на решающих этапах; например, можно выяснить, необходима ли дополнительная очистка при разделении в двухфазной системе для освобождения от митохондрий. Еще одно преимущество негативного контрастирования заключается в том, что этот метод позволяет отличить фрагменты митохондрий от других частиц, содержащих электронтранспортную цепь. Интактный аппарат Гольджи также обнаруживает при негативном контрастировании характерную морфологию, отличную от морфологии плазматической мембраны и тонопласта. Однако различить тонопласт и плазматическую мембрану этот метод не позволяет.

7. Плазматическая мембрана и тонопласт

Разработка методов выделения тонопластов и плазматических мембран из одного гомогената открывает новые возможности для изучения динамических свойств мембран, процессов транспорта, роста растений и других аспектов.

В ранних методиках для выделения и идентификации плазматических мембран из растительных клеток [59, 46] использовали обработку с помощью ФВК при низких pH, при которой происходило специфическое контрастирование мембранных везикул плазматического происхождения. Срезы осадков мембранных фракций фиксировали, заключали в смолу и исследовали с помощью электронного микроскопа [31]. Впоследствии для очистки стали использовать градиенты плотности сахарозы [47, 60—62], водные двухфазные системы, содержащие декстран Т500 или полиэтиленгликоль (ПЭГ) 3350 [63—67], а также электрофокусирование [68].

7.1. Маркеры плазматических мембран растительных клеток

С плазматической мембраной растений ассоциированы два маркера: K^+ -стимулируемая, Mg^{2+} -зависимая АТРаза, ингибируемая ванадатом [69], и глюкансинтаза с высокой K_M для UDP-глюкозы [47], так называемая глюкансинтаза II [70]. Кроме того, плазматическая мембрана растений связывает антагониста полярного транспорта ауксина — N-1-нафтилфталамовую кислоту (НФК) [71]. Показано, что для серий мембранных фракций из колеоптилей овса (рис. 2.7) [30] содержание этого

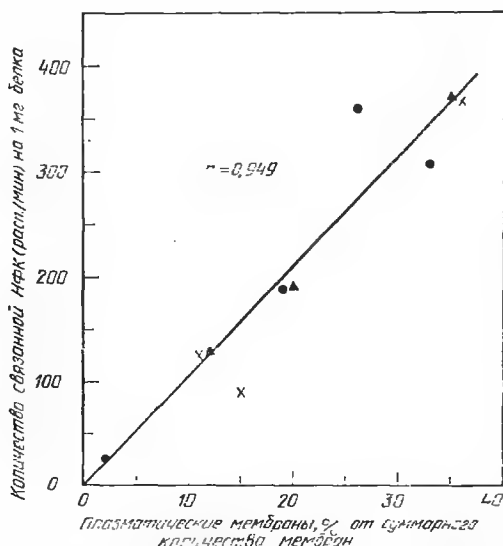


Рис. 2.7. Корреляция между связыванием N-1-нафтилфталамовой кислоты (НФК) и контрастированием ФВК при низких рН для мембранных фракций из колеоптилей овса (*Avena sativa*) [30].

маркера коррелирует с количеством мембран, специфически контрастируемых ФВК при низких рН.

При отсутствии подходящих природных маркеров можно ввести искусственные маркеры (включенная метка) с помощью химической модификации или специфического связывания. В случае растений такие маркеры вводились только в плазматическую мембрану протопластов путем ферментативного нодирования поверхности мембраны с помощью непроникающих реагентов, таких, как диазотистая сульфанилиновая кислота или лектины [72]. Впрочем, достигнутые здесь успехи были не очень значительными из-за отсутствия однозначных данных о специ-

фичности связывания с поверхностью клетки. Для идентификации плазматической мембраны протопластов в качестве электроплотной метки использовали соединения лантана [73].

7.2. Выделение плазматических мембран с помощью распределения в водной двухфазной системе

Методика, описанная здесь для гипокотилей этиолированных проростков сои, аналогична представленной на рис. 2.3 [18, 63] (см. также табл. 1.8).

1. Для выделения плазматических мембран центрифугируют отфильтрованный гомогенат при 6000 *g* в течение 10 мин для удаления митохондрий. Отбрасывают осадок и центрифугируют супернатант 30 мин при 60 000 *g*.

2. Суспендируют осадок в 5 мМ фосфате калия, рН 6,8, и используют его как исходный материал для распределения в двухфазной системе.

3. Готовят двухфазную систему следующего состава: ресуспендированные микросомные мембраны (полученные примерно из 40 г ткани), 6,4%-ный (в/в) декстран Т500 (Pharmacia), 6,4%-ный (в/в) ПЭГ 3350 (Fisher), 0,25 М сахаразы и 5 мМ фосфат калия, рН 6,8.

4. Перемешивают содержимое пробирки, перевернув ее 40 раз. Разделяют две фазы центрифугированием в бакет-роторе с подвесными стаканами при 150 *g* в течение 5 мин.

5. Дважды промывают верхнюю фазу, обогащенную плазматическими мембранами, меняя нижнюю фазу на свежую, и разделяют фазы центрифугированием после каждого перемешивания (переворачивают пробирку 40 раз) (рис. 2.3).

6. Проводят перераспределение мембран между свежей верхней фазой и исходной нижней фазой, а затем двумя нижними фазами, использованными для промывания исходной верхней фазы.

7. Объединяют две верхние фазы, содержащие плазматические мембраны, разбавляют 5 мМ раствором фосфата калия, рН 6,8, содержащим 0,25 М сахаразу, и центрифугируют при 80 000 *g* в течение 30 мин.

7.3. Выделение и идентификация тонопластов

Для выделения тонопластов применяют следующие подходы: послойное автоматическое нарезание тканей [74, 75] или метод, при котором вначале получают протопласты, а затем подвергают их контролируемому лизису с помощью осмотического шока [76—80], механического воздействия [81] или обработки поли-

анионами [82]. Целые вакуоли выявляют благодаря их большому размеру с помощью световой микроскопии и осаждают при очень низких скоростях, например $1g$ [82]. Визуализация вакуолей облегчается тем, что они содержат природные пигменты [74—76]; кроме того, в среду можно добавить нейтральный красный, который проникает внутрь вакуолей и обеспечивает их идентификацию [79, 81, 82]. Как при механическом измельчении, так и при получении протопластов выход вакуолей, как правило, невысок ($<0,5\%$) [74, 83].

В настоящее время вакуоли из растительных тканей получают в основном методом, включающим выделение протопластов [84], и хотя способ механического измельчения имеет то преимущество, что при этом не возникает опасности разрушения органелл, как при выделении протопластов, он используется главным образом в случае плотных тканей — таких, как запасающие корни.

Растительные вакуоли обладают лизирующими свойствами, что позволяет считать их функционально эквивалентными лизосомам млекопитающих [85]; выделенные препараты вакуолей проверяют на наличие гидролазной активности. Чистоту фракции оценивают в первую очередь по отсутствию в ней маркеров других компартментов [34, 80, 81, 84, 86]. Имеются данные о присутствии в вакуолях из сорго цианогенного гликозида дари-на [79, 87], а в вакуолях других растений — ингибитора протеиназ I [83] и малата [82]. Все эти соединения, а также α -маннозидаза [80, 82, 88, 89] содержатся внутри вакуолей и теряются при их разрушении. Согласно теоретическим оценкам, основанным на изменении отношения площади поверхности к объему при постепенном измельчении вакуоли [90], и в соответствии с результатами прямых измерений ферментативной активности [91] при гомогенизации вакуоли ее содержимое на 97% солюбилизируется и лишь 3% остается внутри выделенных замкнутых везикул.

Поиски маркера для везикул, образующихся из тонопласта, привели к обнаружению анионстимулируемой, Mg^{2+} -зависимой, ингибируемой нитратом АТРазной активности, предположительно связанной с тонопластом. Впервые эти данные были получены для везикул из латекса *Hevea brasiliensis* [92, 93], а затем — для изолированных вакуолей из корнеплодов столовой красной свеклы [94]. Однако вопрос об абсолютной специфичности этого маркера остается нерешенным [18]. Мы провели сравнительный анализ высокоочищенных фракций плазматеммы и тонопласта, полученных с помощью электрофореза в свободном потоке (разд. 7) из гомогената этиолированных гипокотилей сои; результаты свидетельствуют о том, что указанная АТРазная активность действительно связана с тонопластом [21].

7.4. Тонoplastные везикулы, обладающие транспортной активностью (замкнутые везикулы)

Замкнутые и проницаемые везикулы эритроцитарных мембран человека можно разделить друг от друга благодаря разнице по плавучей плотности в градиенте плотности высокомолекулярного полимера [95]. Крупные молекулы, например декстран, не проходят через мембрану замкнутых везикул, поэтому внутри них создается пониженное осмотическое давление, однако везикулы при этом не схлопываются. Плотность замкнутых везикул определяется в основном их содержимым (например, везикулы, замкнутые в среде с плотностью 1,03 г/мл, будут находиться в равновесии в растворе с плотностью 1,06 г/мл), а плотность везикул с утечкой — плотностью мембран (1,10—1,20 г/мл). Для выделения везикул с транспортной активностью из обогащенной фракции тонoplastных мембран применяют подслаивающий раствор декстрана с высокой плотностью [96]. Можно использовать также градиенты плотности ренографина. По-видимому, полученные таким образом везикулы обладают более высокой удельной транспортной активностью, чем везикулы, выделенные только с помощью дифференциального центрифугирования или очищенные в градиенте плотности сахарозы, как это следует из приведенных выше соображений [97, 98].

7.5. Выделение тонoplastной и плазматической мембран с помощью последовательного центрифугирования в градиентах плотности сахарозы и глицерола

Для обогащения фракций тонoplastных и плазматических мембран, обладающих способностью к АТФ-зависимому транспорту протонов, можно использовать препаративную методику, включающую два последовательных цикла центрифугирования: в ступенчатом градиенте плотности сахарозы и изопикническое центрифугирование в градиенте плотности глицерола [14, 99]. Эта методика применима, например, в случае этиолированных стеблей растений.

1. Тонко измельчают ткань и растирают ее в ступке пестиком при 0°C в среде, содержащей 8%-ный этаноламин (в/в), 20 мМ ЭДТА, 0,4 мМ β -глицерофосфат натрия (grade III, Sigma), 2 мМ дитиоэритреитол и 0,15 мМ нуперканн или тетраканн (агенты, предохраняющие липиды мембран от быстрого ферментативного расщепления после гомогенизации ткани [100]).

2. Фильтруют гомогенат через нейлоновую ткань и центрифугируют при 4 000 g в течение 10 мин.

3. Наносят супернатант на ступенчатый градиент сахарозы (рис. 2.8) и центрифугируют 30 мин при 90 000 g.

4. Собирают фракции A2 и A3, наносят их на градиенты плотности глицерола (см. п. 5) и вновь центрифугируют. Перед нанесением доводят концентрацию сахарозы во фракции A2 до 0,15 М, используя 1,2 М раствор сахарозы и буфер для гомогенизации.

5. Градиенты плотности глицерола готовят в пробирках для бакет-ротора Вексман SW28.1 (17 мл) или аналогичной ему и центрифугируют в течение 2 ч при 90 000 g.

Детальный анализ маркерных активностей показывает, что B1 представляет собой фракцию тонопластных мембран, тогда

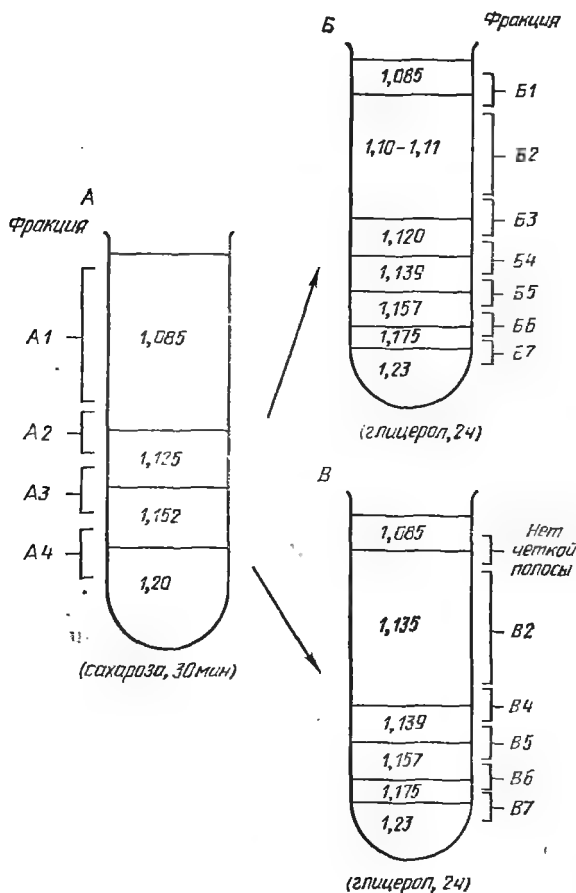


Рис. 2.8. Последовательное использование градиентов сахарозы и глицерола для выделения фракций плазматических мембран и тонопласта из стеблей растений (разд. 7.5). (Из работ [14, 99].)

как B5+B6, а также B5+B6 — фракции плазматических мембран [14, 99].

7.6. Разделение плазматической мембраны и тонопласта с помощью электрофореза в свободном потоке

Электрофорез в свободном потоке (рис. 2.4) позволяет получить из одного гомогената одновременно высокоочищенные фракции и плазматических, и тонопластных мембран. Фракции, находящиеся вблизи места нанесения образца (самые дальние от анода), обогащены плазматическими мембранами, а фракции, наиболее удаленные от места нанесения образца (ближайшие к аноду), — тонопластными мембранами (рис. 2.5). Остальные клеточные компоненты (диктиосомы, эндоплазматический ретикулум, пластиды и митохондрии) располагаются между указанными фракциями. Методика разделения состоит в следующем [21].

1. Гомогенизируют 35—40 г ткани (например, кусочков гипокотилей сои), фильтруют гомогенат через нейлоновую ткань и центрифугируют в течение 10 мин при 6000g.

2. Центрифугируют полученный супернатант в течение 30 мин при 60 000g.

3. Суспендируют осадок в буфере для электрофореза (см. ниже), центрифугируют 30 мин при 60 000g и окончательно ресуспендируют осадок в буфере для электрофореза из расчета около 1 мл буфера на 10 г веса исходной ткани.

Буфер для электрофореза: 0,25 М сахараза, 2 мМ KCl, 10 мкМ CaCl_2 , 10 мМ триэтаноламин и 10 мМ уксусная кислота, pH доведен до 7,5 с помощью NaOH. Электродный буфер: 100 мМ триэтаноламин и 100 мМ уксусная кислота, pH доведен до 7,6 с помощью NaOH.

4. Проводят разделение в ячейке для непрерывного электрофореза в свободном потоке (VaP-5, Bender and Hobein, Munich, FRG или аналогичная установка) при постоянном напряжении 800 В/9,2 см, силе тока 165 ± 10 мА, скорости потока буфера 1,7 мл фракции/ч, скорости внесения образца 2,7 мл/ч и температуре 6 °C. За распределением образца следят по поглощению света с $\lambda = 280$ нм.

5. Собирают мембраны из очищенных или объединенных фракций центрифугированием при 80 000g в течение 30 мин.

8. Митохондрии

Функционально активные митохондрии были выделены из многих источников растительного происхождения [101]. Общие соображения, высказанные в начале главы, в той же степени

применимы и к митохондриям; отдельного обсуждения требует лишь вопрос о выделении их из зеленых тканей [102]. Для выделения митохондрий из растительных гомогенатов в среду добавляют БСА, очищенный от жирных кислот, и агенты, связывающие хиноны, например поливинилпирролидон (ПВП). Превосходными источниками растительных митохондрий являются клубни картофеля (*Solanum tuberosum*), почки цветной капусты (*Brassica oleracea* var. *italica*), соцветия-початки восточной скунсовой капусты (*Symplocarpus foetidus*), а также клубни топинамбура (*Helianthus tuberosus*), хотя на самом деле митохондрии можно быстро получить из любых растительных тканей, включая корни кукурузы (*Zea mays*), проростки гороха (*Pisum sativum*), листья шпината (*Spinacea oleracea*), проростки маша (*Phaseolus aureus*) и корни свеклы (*Beta vulgaris*) и рапса (*Brassica napus*).

1. Гомогенизируют ткань в двух объемах среды, содержащей 0,3 М маннитол (или сахарозу), 4 мМ цистеин, 1 мМ ЭДТА, 30 мМ буфер MOPS, pH 7,8, и 0,1%-ный обезжиренный БСА; иногда добавляют также 0,6% (в/о) ПВП.

2. Фильтруют гомогенат (прочная ячеистая ткань, нейлоновая сетка, Miracloth) и центрифугируют его в течение 3—4 мин при 4000 g, чтобы освободиться от крахмала и пластид.

3. Для осаждения митохондрий центрифугируют супернатант при 10 000 g.

4. Очищают митохондрии от других мембран, присутствующих в осадке, центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [103, 106]. Ресуспенсируют осадок в 4—6 мл среды и наплаивают на непрерывный градиент сахарозы 33—60% (в/в). Центрифугируют при 100 000 g в течение 3 ч (ротатор Вексеп SW-28 или аналогичный). Митохондрии концентрируются в растворе с плотностью 1,19 г/мл, а лизосомы (глиоксисомы) — 1,25 г/мл [193]. Кроме сахарозы, можно использовать перколл [104, 105, 107—111], декстран [112, 113], фиколл [114] или водную двухфазную систему [115, 116]. Разделение в градиентах плотности перколла позволяет получать препараты, характеризующиеся высокой скоростью окисления субстрата и отношением $ADP:O_2$, близким к теоретическому значению [117—119].

5. Для оценки чистоты препарата определяют активность цитохромоксидазы [120] или NADH-сукцинатоксидоредуктазы [49].

Описаны методы субфракционирования митохондриальной фракции на наружные и внутренние мембраны [121], однако маркеры для наружной митохондриальной мембраны растений отсутствуют. Моноаминоксидаза, используемая для этой цели в случае клеток животных, в растительных клетках не может служить маркером, поскольку находится в растворимом состоянии [50]. Чтобы установить локализацию компонентов ды-

хательной цепи, используют субмитохондриальные частицы с ориентацией мембраны, обратной таковой в интактных митохондриях. Их получают обработкой митохондрий ультразвуком с последующим дифференциальным центрифугированием для освобождения от неразрушенных митохондрий [122].

В литературе можно найти данные и о других маркерах (например, о фумаразе, цитохромах); описаны критерии целостности митохондрий (дыхательный контроль, окислительное фосфорилирование) и методы исследования конфигурации мембран [103].

9. Эндоплазматический ретикулум

Существует несколько методов получения эндоплазматического ретикулума из различных растительных источников, в том числе из эндосперма клещевины [123], гипокотилей сои [35, 124] и корней кресс-салата [125, 126]. Эндоплазматический ретикулум из эндосперма клещевины получают следующим образом.

1. Нарезают лезвием бритвы эндосперм двадцати четырехдневных проростков в 8 мл среды следующего состава: 150 мМ трицин (рН 7,5), 10 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 13%-ная (в/в) сахароза.

2. Фильтруют через нейлоновую ткань, доводят объем до 10 мл и освобождаются от обломков центрифугированием при 270 g в течение 10 мин.

3. Наносят супернатант на непрерывный градиент плотности сахарозы (6—60%), приготовленный в буфере следующего состава: 150 мМ трицин, 10 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА (рН 7,5).

4. Центрифугируют при 100 000 g в течение 4 ч (в роторе Beckman SW-28 или аналогичном). Собирают эндоплазматический ретикулум, сконцентрированный в слое с плотностью 1,12 г/мл (см. таблицы в Приложении). Полученная фракция загрязнена другими мембранами (разд. 10).

Идентификация эндоплазматического ретикулума основывается в основном на наличии рибосом, связанных с мембранами; для усиления связывания в среду, использующуюся для выделения, следует добавить Mg^{2+} до конечной концентрации 5—50 мМ. В число ферментов, используемых в качестве маркеров, входят NADPH-цитохром *c* — редуктаза, маннозилтрансфераза [127], терминальные ферменты биосинтеза фосфолипидов [128], такие, как CDP-холинцитидилтрансфераза [123]. Последняя присутствует и в аппарате Гольджи [7, 129]. Используют также цитохром *c* — редуктазу, хотя она содержится и в других клеточных компонентах. При выявлении маннозилтрансферазной реакции, которая в животных клетках протекает, по-видимому, исключительно в эндоплазматическом ретикулуме [130], необходимо

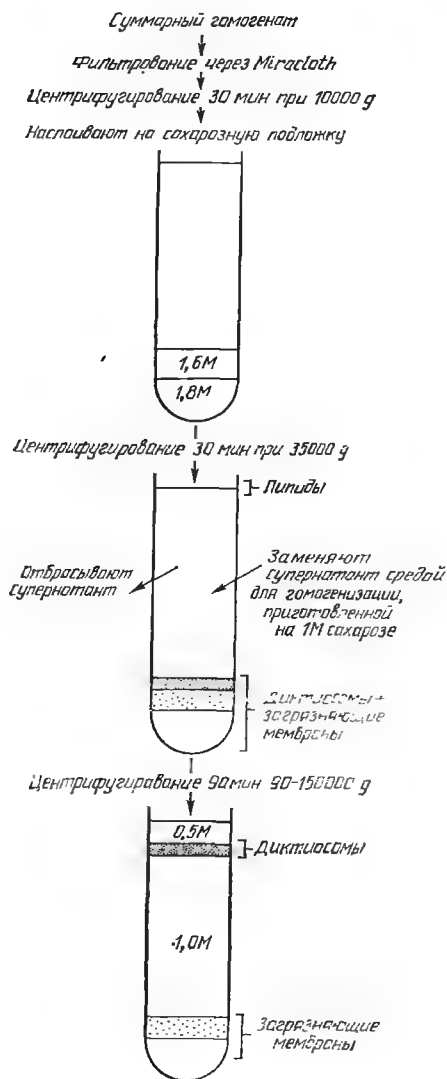


Рис. 2.9. Простая методика выделения диктисом аппарата Гольджи с помощью ступенчатого градиента сахарозы. (Из работы [50].)

идентифицировать растворимый в смеси хлороформ/метанол продукт — производное полиизопренола. Для этого используют несколько тестов, включая хроматографию в ДЭАЭ-целлюлозе (в форме ацетата) и освобождение и идентификацию маннозы при мягком кислотном гидролизе [127]. Глюкозо-6-фосфатаза в растениях отсутствует, и гидролиз глюкозо-6-фосфата в растительных гомогенатах осуществляется при помощи неспецифической растворимой фосфатазы.

Гладкий эндоплазматический ретикулум в растительных клетках встречается гораздо реже, чем в животных. Тем не менее в клетках растений с выделяющими масла железами можно обнаружить обширные области грубого эндоплазматического ретикулума без рибосом [131]. В большинстве же растительных клеток гладкий эндоплазматический ретикулум присутствует только в виде локальных сегментов внутри крупных цистерн, к которым присоединены рибосомы.

Для последующего отделения шероховатого эндоплазматического ретикулума от митохондрий со сходными размером и плотностью необходимо освободить эндо-

плазматический ретикулум от рибосом путем экстракции их с помощью ЭДТА или концентрированных растворов KCl ; при этом уменьшается плотность мембран. Альтернативный подход состоит в увеличении плотности путем добавления магния [132],

индуцирующего агрегацию мембран эндоплазматического ретикулаума. Разделение мембран эндоплазматического ретикулаума и митохондрий проводят также с помощью электрофореза в свободном потоке [23].

10. Аппарат Гольджи

Фракции мембран аппарата Гольджи были получены из источников растительного происхождения путем центрифугирования в непрерывном [133, 134] или ступенчатом [24, 50] градиенте плотности сахарозы, а также с помощью зонального центрифугирования [26]. Пример простой методики выделения фракции мембран, обогащенной аппаратом Гольджи, из стеблей сои представлен на рис. 2.9. В среду для выделения добавляют декстран до конечной концентрации 1%; выделение необходимо проводить как можно быстрее, поскольку стопки диктиосом постепенно разрушаются [24]. Идентификация органелл основывается на их характерной морфологии (перфорированные цистерны) [3] и плотности в градиенте сахарозы (1,12 г/мл), а также на наличии латентной IDРазной активности [26, 39] и активности глюкансинтазы I [70] (последняя была описана вначале как активность с высокой K_m для UDP-глюкозы [47]). Методы оценки активности латентной IDРазы могут различаться. Первая описанная методика основывалась на снятии латентности при хранении фракции в течение нескольких суток при низкой температуре [26]. Этот тип латентности, по-видимому, специфичнее, чем более обычный, связанный с целостностью структуры, который характеризуется исчезновением латентности при разрушении мембран под действием детергентов [39]. Хотя между двумя указанными активностями существует определенный параллелизм [135], последняя из них обычно распространена среди клеточных компонентов несколько шире, чем первая.

Из растительных клеток пока удается получить мембранные фракции, обогащенные аппаратом Гольджи не более чем на 50%. Фракция, выделенная из гипокотилей сон (рис. 2.9) и охарактеризованная морфометрически, а также по активности ферментов-маркеров, имеет следующий состав: 45% — мембраны аппарата Гольджи, 15% — плазматическая мембрана, 4% — тонопласт, 1% — митохондрии, 18% — эндоплазматический ретикулум, 10% — плазмиды, 7% — неидентифицированный белок [50].

Секреторные везикулы, происходящие из аппарата Гольджи, были выделены из пыльцевых трубок путем последовательного использования двух методов: разделения по размерам (нуклеопоровый фильтр) и центрифугирования [136]. Позже была разработана методика, основанная на двухэтапном центрифугировании, для получения везикул из прорастающей пыльцы [137]; показано, что с мембранами этих везикул ассоциирована β -глю-

кансинтазная активность [138—140]. Сравнительно недавно описаны методы выделения так называемых фракций секреторных везикул из других источников растительного происхождения [141—143]; правда, полученные фракции плохо охарактеризованы.

11. Пластиды

Привести какую-либо единую методику выделения пластид невозможно, поскольку выбор того или иного способа зависит и от типа ткани, и от стадии развития пластид, подлежащих выделению. Тем не менее мы рассмотрим несколько методов выделения различных типов пластид и их субфракций.

11.1. Хлоропласты

Для получения функционально активных хлоропластов лучше всего использовать ткани шпината или гороха. Здесь мы вкратце рассмотрим методику выделения хлоропластов, подробно описанную в работе [144].

Для создания в среде для выделения хлоропластов необходимого осмотического давления в нее обычно добавляют сорбитол до конечной концентрации 0,33 М, хотя можно использовать также различные сахара (например, сахарозу) и сахарные спирты (например, маннитол). Выбор буфера также не принципиален, но обычно используют пирогосфат, трис, MES и HEPES. Чтобы предотвратить агрегацию, в состав среды в малых количествах можно включить $MgCl_2$ и $MnCl_2$, а также неорганический фосфат и/или ЭДТА. В качестве защитных агентов в среду вносят изоаскорбат и БСА. Чтобы увеличить выход хлоропластов, перед гомогенизацией листья экспонируют на ярком свете в течение 20—30 мин.

1. На одну часть листьев с удаленными жилками берут одну часть среды (см. выше). Измельчают листья в гомогенизаторе типа Уоринга (на полной скорости, 3—5 с) или с помощью поллитрона (на низкой скорости, до 3 с). Время гомогенизации увеличивать нежелательно, поскольку при этом возрастает число разрушенных хлоропластов.

2. Фильтруют гомогенат (Mircloth, нейлоновая сетка или прочная ячеистая ткань) и центрифугируют до 90 с при 6000—8000 g в роторе с подвесными стаканами. Часто применяют и другие режимы с более низкими скоростями центрифугирования, например 1000—2000 g, 20—60 с [36].

3. Отбрасывают супернатант и промывают поверхность осадка небольшим количеством среды, чтобы удалить разрушенные хлоропласты, находящиеся в верхнем слое.

4. Ресуспендируют оставшийся осадок, обогащенный интактными хлоропластами, в малом количестве среды, слегка вращая пробирку или гомешивая содержимое мягкой кисточкой.

Для дальнейших исследований функций хлоропластов или их состава полученную фракцию необходимо очистить. Следует иметь в виду, однако, что хлоропласты, очищенные центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, могут почти полностью потерять способность к фиксации CO_2 . Более пригодными оказались методики с использованием скоростного и изопикнического центрифугирования [145, 146] или разделение по скоростям [147]. Хлоропласты с достаточно хорошо сохранившейся фотосинтетической активностью удается получить и в градиентах плотности перколла [148—151]. Хорошие результаты дает также применение комбинированных градиентов перколла, ПЭГа и фиколла [152]. Высокоочищенную фракцию хлоропластов можно получить с помощью препаративного электрофореза в свободном потоке [153, 154] или распределения в водной двухфазной системе, содержащей полимеры [155, 156].

Круг растений, из которых получают функционально активные хлоропласты, заметно расширился с применением в качестве исходного материала протопластов [144]. Впрочем, необходимо отметить, что по некоторым сообщениям выделение протопластов *reg se* влияет на ряд физиологических свойств, например на синтез белков [157], метаболизм липидов и жирных кислот [158—159], выделение O_2 и фиксацию CO_2 [160].

Наиболее чувствительным индикатором функциональной целостности хлоропластов являются интактность и эффективность процесса ассимиляции CO_2 [144]. Чтобы проконтролировать интактность хлоропластов, можно также воспользоваться любым субстратом, не проникающим через их оболочку. Одно из наиболее простых и широко используемых для этой цели соединений — феррицианид, играющий роль окислителя в реакции Хилла. Полноценность процесса ассимиляции CO_2 оценивают, измеряя эффективность фотосинтеза [161].

В качестве маркера для хлоропластов чаще всего используют хлорофилл [162], но такой тест не позволяет различать интактные пластиды и свободные тилакоиды. Другие обычно применяющиеся маркеры представлены ферментами, локализованными в стромах, такими, как ферменты восстановительного пентозофосфатного пути (например, NADP^+ -зависимая глицеральдегидфосфатдегидрогеназа и рибулозодифосфаткарбоксилаза [144]).

11.2. Субфракции хлоропластов

Функционально активные тилакоиды лучше всего выделять из интактных хлоропластов, поскольку тилакоиды, полученные

из гомогената, могут деградировать при выделении. Изолированные хлоропласты суспендируют в гипотонической среде [163], и образовавшиеся тилаконды собирают дифференциальным центрифугированием. Тилакоидные везикулы с разной ориентацией (вывернутые и с правильной ориентацией) можно получить из собранных в стопки тилакондов с помощью пресса Yeda с последующим перераспределением в водной двухфазной системе, содержащей полимеры [164]. В качестве маркеров для тилакоидов используют как мембранные компоненты, так и реакции, присутствующие фотосистемам.

Начало выделению оболочек хлоропластов было положено работой Макендера и Лича [165]; описана методика выделения высокоочищенной фракции оболочек из интактных хлоропластов с помощью мягкого осмотического шока с последующим центрифугированием в непрерывном градиенте плотности сахарозы [86, 166—168]. Если хлоропласты очищают в градиенте плотности перколла, их необходимо отмыть до разрушения, иначе можно получить смешанные фракции мембран [169].

Чтобы разделить внутреннюю и наружную мембраны, хлоропласты суспендируют в гипертоническом буфере и разрушают, подвергнув несколько раз процедуре замораживания — оттаивания [170], пропустив через пресс Френча [171] или используя стеклянный гомогенизатор [172]. При центрифугировании в ступенчатом градиенте плотности сахарозы выделяются две фракции оболочек, отличные от других субфракций хлоропластов. Ферменты-маркеры для мембран оболочки описаны в работе [172].

11.3. Этиопласты

Этиопласты обычно образуются в тех случаях, когда ткани, в которых развитие пластид в норме приводит к образованию хлоропластов (т. е. листья, стебли), выдерживают в темноте.

Методы выделения этиопластов аналогичны таковым для хлоропластов, за исключением тех модификаций, которые обусловлены различиями в размере и плотности. Представленная здесь методика выделения этиопластов из листьев выращенной в темноте пшеницы основана на центрифугировании грубой фракции этиопластов в градиенте плотности перколла [173].

1. Собирают листья на рассеянном зеленом свете.

2. Гомогенизируют примерно 35 г листьев в 200 мл среды для выделения (0,5 М сахароза, 10 мМ HEPES, 20 мМ TES, доводят pH до 7,6 КОН) с помощью гомогенизатора Уоринга на полной скорости два раза по 5 с.

3. Фильтруют гомогенат через восемь слоев хлопчатобумажной марли и один слой нейлоновой ткани (размер ячеек 15 мкм) и два раза промывают остаток 20 мл среды для выделения.

4. Центрифугируют фильтрат в течение 6 мин при 1000 *g* в угловом роторе (Sorvall, SS-34).

5. Ресуспандируют грубый осадок этиопластов в среде для выделения и наносят на градиент перколлы, суспендированного в среде для выделения [25% (о/о)], с подложкой [67% (о/о)].

6. Центрифугируют в течение 20 мин при 1000 *g* (Sorvall, бакет-ротор с подвесными стаканами, HB-4) и собирают этиопласты в слое с концентрацией перколлы 25—67%.

7. Отмывают этиопласты средой для выделения, отцентрифугировав их в течение 15 мин при 1000 *g*_{max} (ротор Sorvall, HB-4). Повторяют эту процедуру еще раз.

Чтобы проследить за относительным обогащением этиопластами, измеряют содержание каротиноидов и дигалактозилдиацилглицеролов [38]. Степень очистки фракции можно определить с помощью морфометрического анализа препаратов, подготовленных для трансмиссионной электронной микроскопии: мембраны этиопластов интенсивно и избирательно окрашиваются при фиксации водным раствором перманганата [38].

11.4. Субфракционирование этиопластов

Фракцию, содержащую наружную оболочку этиопластов, можно выделить по методике, разработанной для наружной оболочки хлоропластов [174]. После удаления наружной оболочки этиопластов можно провести фракционирование внутренних мембран, проламеллярных тел и протилакоидов после гомогенизации с помощью либо стеклянного гомогенизатора [175, 176], либо обработки ультразвуком [173, 177]. Проламеллярные тела можно отделить от фракции протилакоидов центрифугированием в непрерывном или ступенчатом градиенте плотности сахарозы. При обработке ультразвуком происходит резкое обеднение фракции проламеллярных тел [177], причем фрагменты этих органелл загрязняют протилакоидную фракцию. Степень загрязнения возрастает с увеличением интенсивности воздействия [173].

11.5. Амилопласты

Амилопласты обнаруживаются в незеленых тканях растений и содержат от одной до нескольких крахмальных гранул на пластиду. Фракция амилопластов выделена из разных источников — из клубней картофеля [37], суспензионной культуры клеток сои [178] и платана [179], эндосперма кукурузы [180] и корней гороха [181]. Для выделения амилопластов ткань разрушают либо механически [37, 181], либо с помощью ферментов [178—180], затем амилопласты собирают осаждением [37, 180] или низкоскоростным центрифугированием [178, 179, 181]. Фракция ами-

лопластов, полученная при центрифугировании, может содержать крахмальные гранулы без мембранной оболочки. Пластиды с многочисленными крахмальными гранулами (например, амилопласты из корней гороха), как правило, более стабильны при центрифугировании, чем амилопласты с единственным крахмальным зерном [180].

Амилопласты выделяют из корней выращенных в темноте растений гороха согласно следующей методике [181].

1. Измельчают примерно 20 г корней лезвием бритвы в одном объеме среды, содержащей 50 мМ трицин-NaOH, pH 7,9, 330 мМ сорбитол, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ $MgCl_2$, 0,1%-ный БСА, затем без усилий растирают пестиком в ступке.

2. Фильтруют гомогенат через шесть слоев муслина и центрифугируют в течение 1 мин при 200 g, чтобы освободиться от интактных клеток, ядер и клеточных обломков.

3. Переносят аликваты полученного супернатанта по 10—15 мл в центрифужные пробирки и подслаивают под них по 10 мл раствора, содержащего 50 мМ трицин-NaOH, pH 7,9, 330 мМ сорбитол, 0,1%-ный БСА и 10%-ный (о/о) свежеотдиализованный перколл.

4. Центрифугируют в течение 5 мин при 4000 g в бакет-роторе с подвесными стаканами, чтобы осадить амилопласты. Осторожно ресуспендируют осадок амилопластов.

В число маркеров для содержащих строуму амилопластов входят нитратредуктаза, глутаматсинтаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; описание способов регистрации этих ферментативных активностей можно найти в работе [181]. Интактность полученных пластид оценивают по латентности и устойчивости к обработке трипсином [178, 181].

Судьба мембран разрушенных амилопластов остается неизвестной при рассмотрении большинства предлагаемых схем фракционирования тканей. В качестве маркеров для этих мембран используют каротиноиды и галактолипиды [37, 38], а также способность к биосинтезу галактолипидов [37].

11.6. Хромопласты

Хромопласты образуются в тканях из хлоропластов или амилопластов путем модификации внутренних мембран и характеризуются высоким содержанием нефотосинтетических пигментов, в основном каротиноидов. Источником хромопластов могут служить некоторые растительные ткани, например лепестки *Narcissus pseudonarcissus* [182—184] и *Tropaeolum majus* [185], плоды *Capsicum annuum* [186] и *Lycopersicon esculentum* [187]. Как правило, ткань гомогенизируют механически, и грубую фракцию хромопластов очищают от других клеточных компонен-

тов дифференциальным центрифугированием и/или центрифугированием в градиенте плотности.

Исследованы локализованные в хромопластах ферменты; это связанные с мембранами ферменты, участвующие в синтезе галактолипидов [183, 185] и β -каротена [184].

11.7. Пластоглобулы

Пластоглобулы представляют собой капли, богатые липидами, различимые с помощью трансмиссионной электронной микроскопии благодаря своей осмиефильности. Они присутствуют в большинстве типов пластид [188—191]. Из-за своей низкой плотности пластоглобулы обычно собираются на поверхности градиентов плотности сахарозы после центрифугирования разрушенных пластид. Выделяют пластоглобулы из грубой фракции хлоропластов или хромопластов следующим образом [188].

1. Суспендируют пластиды в буфере (1 мМ фосфатный буфер, pH 7,6, 0,1 мМ дитиозиритреитол) и обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин при 20 кГц. Можно также пропустить суспензию через пресс Френча при давлении 50 МПа.

2. Центрифугируют полученную суспензию в течение 60 мин при 150 000 g в угловом роторе.

3. Собирают сверху слегка замутненный слой, содержащий пластоглобулы и агломерат пластоглобул со стенок пробирки и переносят их в 5%-ный раствор фиколла в фосфатном буфере, pH 7,6.

4. Готовят в центрифужной пробирке ступенчатый градиент для флотации: на суспензию пластоглобул (на дне) наслаивают 2,5%-ный раствор фиколла в фосфатном буфере, pH 7,6, и заполняют пробирку 1 мМ фосфатным буфером, pH 7,6. Центрифугируют в течение 90 мин при 250 000 g в бакет-роторе с подвесными стаканами.

5. Собирают пластоглобулы с верхнего слоя градиента и повторяют промывание (п. 4 и 5) по меньшей мере шесть раз.

6. Чтобы предотвратить агрегацию пластоглобул, суспензию перед употреблением слегка обрабатывают ультразвуком.

По поводу состава пластоглобул см. работы [188—191].

12. Ядра и ядерные оболочки

Ядра обычно выделяют из профильтрованного гомогената, полученного путем измельчения ткани (автоматический резак с бритвенным лезвием, политрон, ступка и пестик). Для этого гомогенат подвергают низкоскоростному центрифугированию (500 g, 10 мин), а затем наслаивают на 2,3 М раствор сахарозы и вновь центрифугируют. Ядра проходят через раствор сахарозы

за 60 мин центрифугирования при 60 000 *g*, тогда как другие мембраны остаются сверху [192].

Содержание и чистоту ядерных препаратов можно контролировать с помощью световой и электронной микроскопии. Единственный критерий интактности состоит в сохранности наружного и внутреннего слоев ядерной оболочки. Ферментные маркеры для ядер неизвестны (см. также гл. 1). Самым распространенным источником загрязнений являются ламеллярные и тубулярные структуры эндоплазматического ретикулума, связанные с наружным слоем ядерной оболочки. Приемлемый выход ядер из гомогената составляет 20—25% (от суммарной ДНК). Подробности выделения и характеристики ядер растительных клеток можно найти в работе [193].

12.1. Ядерные оболочки

Ядерные оболочки растительных клеток уже охарактеризованы [41]. Их химический и ферментный состав очень близок (а возможно, идентичен) к составу шероховатого эндоплазматического ретикулума. Интактные ядерные оболочки или их фрагменты можно идентифицировать с помощью электронной микроскопии срезов или негативно контрастированных препаратов благодаря наличию характерного порового комплекса, который связывает внутренний и наружный слои оболочки.

Приведем стандартный метод выделения ядерных оболочек из растительных и животных клеток.

1. Суспендируют выделенные в сахарозе ядра в дистиллированной воде. Ядра быстро набухают, их оболочка разрушается и в среду высвобождаются хроматин и ядрышки.

2. После мягкой обработки ультразвуком и низкоскоростного центрифугирования (300 *g*, 3 мин) для освобождения от обломков и интактных ядер очищают ядерные оболочки, наложив суспензию на подложку из 62%-ной сахарозы (в/о) и отцентрифугировав в течение 30 мин при 3000 *g*.

3. Ядрышки и хроматин осаждаются на дно, а мембраны оболочек остаются на подложке, с которой их собирают и осаждают центрифугированием [194, 195].

12.2. Хроматин и ядрышко

Чтобы отделить ядрышки от фрагментов хроматина, ядра лизируют тритоном и затем центрифугируют при 2000 *g* в 30%-ном глицероле. Ядрышки осаждаются, а хроматин остается в супернатанте [196].

13. Микротельца

Микротельца (пероксисомы, глиоксисомы) имеют форму сферы диаметром 0,5—1,5 мкм. Их характерными особенностями являются наличие одинарной ограничивающей мембраны, плотной стромы или гранулярного матрикса, которые выявляются при окрашивании на каталазу; их равновесная плотность в градиенте сахарозы 1,24—1,26 г/мл [197, 198]. Пероксисомы обычно выделяют из листьев шпината, а глиоксисомы — из эндосперма клещевины.

Поскольку мембрана, ограничивающая микротельца, одинарна, они могут разрушаться при выделении. Поэтому необходимо использовать как можно более мягкие способы гомогенизации тканей и избегать повторных центрифугирований и ресуспендирований. Для выделения глиоксисом из эндосперма клещевины можно использовать следующий метод [199].

1. Измельчают ткань эндосперма бритвенным лезвием; на 1 г ткани берут 1 мл среды для гомогенизации следующего состава: 0,45 М сахароза, 150 мМ трицин-КОН, pH 7,5, 0,1 мМ $MgSO_4$, 0,1 мМ KCl, 0,05 мМ $CaSO_4$, 0,1%-ный БСА.

2. Фильтруют гомогенат через нейлоновую ткань.

3. Наслаивают 15—20 мл отфильтрованного гомогената на линейный (15—60%, в/в) градиент плотности сахарозы, содержащий 2,5 мМ трис-MES, pH 7,2, и центрифугируют 1 ч при 80 000 g в бакет-роторе с подвесными стаканами.

4. Собирают фракцию глиоксисом (плотность 1,24 г/мл) и медленно разбавляют ее 10 объемами буфера следующего состава: 13,5% (в/в) сахарозы, 0,1 мМ $MgSO_4$, 0,1 мМ KCl, 0,05 мМ $CaSO_4$, 10 мМ трис-MES, pH 6,8, 0,05% БСА.

5. Осаждают глиоксисомы центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин.

Обломки клеток, ядра и интактные пластиды можно удалить из гомогената эндосперма низкоскоростным центрифугированием (150—300 g, 10 мин) и при необходимости сконцентрировать микротельца центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 g перед наслоением на градиент плотности сахарозы [200].

Помимо каталазы глиоксисомы из листьев содержат ферменты метаболизма гликолата. Глиоксисомы тканей, запасующих жиры, содержат ферменты β -окисления жирных кислот и ферменты глиоксилатного цикла [197—204].

Фракции микротелец, полученные с помощью центрифугирования в градиенте плотности, редко бывают загрязнены другими органеллами. Впрочем, не существует и какого-либо определенного способа измерения содержания небольших количеств примесей во фракции микросом, за исключением морфологических исследований осадка. Обычные маркеры для идентифика-

ции микротелец в очищенных фракциях — каталаза и пероксидаза — сконцентрированы в микротельцах, но встречаются и во многих других мембранных фракциях.

14. Окаймленные везикулы

Растительные клетки содержат окаймленные ямки и везикулы [205]. Оба образования распознаются по ультраструктуре — наличию характерного клатринового покрова на поверхности плазматической мембраны. Предполагается, что эти структуры участвуют как в экзоцитозе [206], так и в эндоцитозе [206, 207].

Для выделения окаймленных везикул из протопластов суспензионной культуры клеток сои разработан следующий метод [208].

1. Ресуспандируют промытые протопласты в трех объемах среды для гомогенизации [100 мМ PIPES, pH 6,9, 2 мМ дитиоэритритол, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ $MgCl_2$, 0,30 М сорбитол] и гомогенизируют 50 ходами охлажденного гомогенизатора Даунса с неплотно пригнанным пестиком.

2. Центрифугируют гомогенат 10 мин при 1000 g_{max} .

3. Наслаивают супернатант на линейный (15—60%, в/в) градиент плотности сахарозы в градиентном буфере следующего состава: 45 мМ MES, pH 6,5, 1 мМ ДТЭ, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ $MgCl_2$ и центрифугируют 3 ч при 140 000 g_{cp} в вертикальном роторе, медленно набирая скорость до 10 000 об/мин и медленно останавливая ротор.

4. Собирают нижнюю фракцию объемом 2 мл. Разбавляют эту фракцию, обогащенную окаймленными везикулами (концентрация сахарозы 48—52%, в/в), двумя объемами градиентного буфера и центрифугируют 70 мин при 75 000 g_{max} для осаждения окаймленных везикул.

5. Чтобы очистить обогащенную окаймленными везикулами фракцию, разбавляют 48—52%-ную фракцию градиентным буфером до концентрации сахарозы 10% (в/в) и наслаивают на линейный 15—25%-ный (в/в) сахарозный градиент. Центрифугируют 90 мин при 16 000 g_{cp} и собирают нижнюю фракцию объемом 1,5 мл. Окаймленные везикулы собираются в полосе с концентрацией сахарозы 16—18%.

Окаймленные везикулы из протопластов сои содержат главный полипептид с относительной массой 180—190 кДа [42—44, 208] и обнаруживают активность глюкансинтетазы I [209].

15. Заключительные замечания

Сейчас мы имеем возможность получать в изолированном виде все компоненты растительной клетки, хотя и не обязательно из одного гомогената. Оставляя в стороне это ограниче-

ние, отметим, что очень важно проводить исследования с использованием только тщательно охарактеризованных субклеточных фракций. Необходимо учесть все основные клеточные компоненты (включая тонопласт и пластиды) и представить морфологическую картину фракции, проведя электронно-микроскопический анализ репрезентативной части осадка. По возможности должен быть представлен весь осадок в виде достаточного количества препаратов, и все препараты должны быть охарактеризованы для получения количественных данных. Кроме того, нужно составить таблицы распределения активностей, как только это представится возможным, для всех маркеров и клеточных компонентов, которые были зарегистрированы, и оценить выход активностей. Только таким образом можно в полной мере использовать те возможности, которые дают методы фракционирования растительных клеток.

Литература

1. *Morré D. J., Gripschover B., Boss W. J., Tuite P. J.* (1984). *Annals of the Phytochemistry Society of Europe*. Boudet A. M., Alibert G., Marigo G., Lea P. J. (eds.), Clarendon Press, Oxford, Vol. 64, p. 247.
2. *Morré D. J.* (1973). In: *Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology*. Chrispeels M. J. (ed.), John Wiley, New York, p. 1.
3. *Morré D. J.* (1971). *Methods Enzymol.*, 22, 130.
4. *Mollenhauer H. H., Morré D. J., Kogut C.* (1969). *Exp. Mol. Pathol.*, 11, 113.
5. *Cunningham W. P., Morré D. J., Mollenhauer H. H.* (1966). *J. Cell Biol.*, 28, 169.
6. *Morré D. J., Mollenhauer H. H., Chambers J. E.* (1965). *Exp. Cell Res.*, 38, 672.
7. *Morré D. J., Nyquist S., Rivera E.* (1970). *Plant Physiol.*, 45, 800.
8. *Morré D. J.* (1970). *Plant Physiol.*, 45, 791.
9. *Kappler R., Kristen U., Morré D. J.* (1986). *Protoplasma*, 132, 38.
10. *deDuve C.* (1967). *Science*, 189, 186.
11. *Morré D. J., Cline G. B., Coleman R., Evans W. H., Glaumann H., Headon D. R., Reid R., Siebert G., Widnell C. C.* (1979). *Eur. J. Cell Biol.*, 19, 231.
12. *deDuve C.* (1964). *J. Theor. Biol.*, 6, 33.
13. *Anderson N. G., Harris W. W., Barber A. A., Rankin C. T., Jr., Candler E. L.* (1966). *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 21, 253.
14. *Scherer G. F. E.* (1984). *Planta*, 160, 348.
15. *Chadwick C. M., Northcote D. H.* (1980). *Biochem. J.*, 186, 411.
16. *Albertsson P. A.* (1958). *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 328.
17. *Albertsson P. A., Andersson B., Larsson C., Akerlund H. E.* (1982). *Methods Biochem. Anal.*, 28, 115.
18. *Larsson C.* (1985). In: *Modern Methods of Plant Analysis, New Series*. Linskins H. F., Jackson J. F. (eds.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Vol. 1, p. 85.
19. *Hannig K., Heidrich H.-G.* (1977). In: *Cell Separation Methods, Part IV. Electrophoretic Methods*. Bloemendal H. (ed.), Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York, p. 93.
20. *Morré D. J., Creek K. E., Matyas G. R., Minnifield N., Sun I., Baudoin P., Morré D. M., Crane F. L.* (1984). *BioTechniques*, 2, 224.

21. Sandelius A. S., Penel C., Auderset G., Brighman A., Millard M., Morré D. J. (1986). *Plant Physiol.*, **81**, 177.
22. Auderset G., Sandelius A. S., Penel C., Brightman A., Greppin H., Morré D. J. (1986). *Plant Physiol.*, **68**, 1.
23. Morré D. J., Lem N. W., Sandelius A. S. (1984). In: *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*. Siegenthaler P. S., Eichenberger W. (eds.), Elsevier Science, Amsterdam, p. 325.
24. Morré D. J., Mollenhauer H. H. (1964). *J. Cell Biol.*, **23**, 295.
25. Morré D. J., Hamilton R. L., Mollenhauer H. H., Mahley R. W., Cunningham W. P., Cheetham R. D., LeQuire V. A. (1970). *J. Cell Biol.*, **44**, 492.
26. Ray P. M., Shininger T. L., Ray M. M. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 605.
27. Morré D. J., Merlin L. M., Keenan T. W. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 605.
28. Schachter H., Jabbal I., Hudgin R. L., Pinteric L., McGuire E. J., Roseman S. (1970). *J. Biol. Chem.*, **245**, 1090.
29. Fleischer B., Fleischer S., Ozawa H. (1969). *J. Cell Biol.*, **43**, 59.
30. Lembi C. A., Morré D. J., Thomson K. St., Hertel R. (1971). *Planta*, **99**, 37.
31. Roland J. C., Lembi C. A., Morré D. J. (1972). *Stain Technol.*, **47**, 195.
32. Marin B., Cretin H., D'Auzac D. (1982). *Physiol. Veg.*, **20**, 333.
33. Powell M. F., Bracker C. E., Morré D. J. (1983). *Protoplasma*, **111**, 87.
34. Quail P. H. (1979). *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 425.
35. Lem N., Morré D. J. (1985). *Protoplasma*, **128**, 14.
36. Jensen R. G., Bassham J. A. (1966). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 1095.
37. Fishwick M. J., Wright A. J. (1980). *Phytochemistry*, **19**, 55.
38. Harkman W. J., Morré D. J., Bracker C. E., Mollenhauer H. H. (1979). *Plant Physiol.*, **64**, 398.
39. Morré D. J., Lembi C. A., VanDerWoude W. J. (1977). *Cytobiologie*, **17**, 165.
40. Vigil E. L. (1973). *Sub-Cell Biochem.*, **2**, 237.
41. Phillip E., Franke W. W., Keenan T. W., Stadler J., Jarasch E. (1976). *J. Cell Biol.*, **68**, 11.
42. Pearse B. M. F. (1975). *J. Mol. Biol.*, **97**, 93.
43. Robinson D. G. (1985). *Plant Membranes*. Wiley Interscience, New York.
44. Mersey B. G., Fowke K. C., Constabel F., Newcomb E. H. (1982). *Exp. Cell Res.*, **141**, 459.
45. Hodges T. K., Leonard R. T. (1974). *Methods Enzymol.*, **32**, 392.
46. Hardin J. W., Cherry J. H., Morré D. J., Lembi C. A. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 3146.
47. VanDerWoude W. J., Lembi C. A., Morré D. J., Kidinger J. A., Ordin L. (1974). *Plant Physiol.*, **54**, 333.
48. Scherer G. F. E. (1984). *Planta*, **161**, 395.
49. Pennington R. J. (1969). *Biochem. J.*, **80**, 649.
50. Morré D. J., Buckhout T. J. (1979). In: *Plant Organelles*. Reid E. (ed.), Ellis Horwood, Chichester, p. 117.
51. Cooperstein S. A., Lazarow A. (1951). *J. Biol. Chem.*, **189**, 665.
52. Bowles D. J., Quail P. H., Morré D. J., Hartman G. C. (1979). In: *Plant Organelles. Methodological Surveys B: Biochemistry*. Reid E. (ed.), Ellis Horwood, Chichester, Vol. 9, p. 207.
53. Loud A. V. (1962). *J. Cell Biol.*, **15**, 481.
54. Morré D. J., Yungmans W. N., Vigil E. L., Keenan T. W. (1974). In: *Methodological Developments in Biochemistry. Subcellular Studies*. Reid E. (ed.), Longman/London, Vol. 4, p. 195.
55. Blouin A., Bolender R. P., Weibel E. (1977). *J. Cell Biol.*, **72**, 441.
56. Croze E., Morré D. J. (1984). *J. Cell Physiol.*, **72**, 441.
57. Luft J. M. (1961). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409.

58. Spurr A. R. (1969). *J. Ultrastruct. Res.*, **26**, 31.
59. Hodges T. K., Leonard R. T., Bracker C. E. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3307.
60. Anderson R. L., Ray P. M. (1978). *Plant Physiol.*, **61**, 723.
61. Nagahashi G., Leonard R. T., Thomson W. W. (1978). *Plant Physiol.*, **61**, 993.
62. Pierce W. S., Hendrix D. L. (1979). *Planta*, **146**, 161.
63. Kjellbom P., Larsson C. (1984). *Physiol. Plant.*, **62**, 501.
64. Lundborg T., Widell S., Larsson C. (1981). *Physiol. Plant.*, **52**, 89.
65. Uemura M., Yoshida S. (1983). *Plant Physiol.*, **73**, 586.
66. Widell S., Lundborg T., Larsson G. (1982). *Plant Physiol.*, **70**, 1429.
67. Yoshida S., Uemura M., Niki T., Sakai A., Augusta L. V. (1983). *Plant Physiol.*, **72**, 105.
68. Griffing L. R., Quantro R. S. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4804.
69. Hodges T. K. (1976). In: *Transport in Plants II. Part A. Cells*. Luttge U., Pitman M. G. (eds.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, p. 260.
70. Ray P. M. (1977). *Plant Physiol.*, **59**, 594.
71. Hertel R. (1974). In: *Membrane Transport in Plants*. Zimmerman W., Dainty J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin/New York, p. 859.
72. Hall J. L. (1983). In: *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells*. Hall J. L., Moore A. L. (eds.), Academic Press, New York, p. 55.
73. Taylor A. R. D., Hall J. L. (1978). *Protoplasma*, **96**, 613.
74. Leigh R. A., Branton D. (1976). *Plant Physiol.*, **58**, 656.
75. Leigh R. A., Branton D., Marty F. (1979). *Plant Organelles, Methodological Surveys B. Biochemistry*. Reid E. (ed.), Ellis Horwood, Chichester, p. 69.
76. Wagner C. R., Siegelman H. W. (1975). *Science*, **190**, 1298.
77. Butcher H. C., Wagner G. J., Siegelman H. W. (1977). *Plant Physiol.*, **59**, 1098.
78. Lin W., Wagner G. J., Siegelman H. W., Hind G. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 110.
79. Saunders J. A., Conn E. E. (1978). *Plant Physiol.*, **61**, 154.
80. Boller T., Kende H. (1979). *Plant Physiol.*, **63**, 1123.
81. Nishimura M., Beevers H. (1978). *Plant Physiol.*, **62**, 44.
82. Buser C., Matile P. (1977). *Z. Pflanzenphysiol.*, **82**, 462.
83. Walker-Simmons M., Ryan C. A. (1977). *Plant Physiol.*, **60**, 61.
84. Wagner C. R. (1983). In: *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells*. Hall J. L., Moore A. L. (eds.), Academic Press, New York/London, p. 83.
85. Marty M. F. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 852.
86. Douce R., Holtz R. B., Benson A. A. (1973). *J. Biol. Chem.*, **248**, 7215.
87. Saunders J. A., Conn E. E., Lin C. H., Stocking C. R. (1977). *Plant Physiol.*, **59**, 647.
88. Matile P. (1975). *The Lytic Compartment of Plant Cells*. Springer-Verlag, Vienna/New York.
89. Matile P. (1966). *Z. Naturforsch.*, **21**, 871.
90. Twohig F. (1974). MS Thesis, Purdue University.
91. Twohig F., Morré D. J., Vigil E. L. (1974). *Proc. Indian Acad. Sci.*, **83**, 86.
92. Marin B., Marin-Lanza M., Komor E. (1981). *Biochem. J.*, **198**, 365.
93. Marin B. (1983). *Planta*, **157**, 324.
94. Walker R. R., Leigh R. A. (1981). *Planta*, **153**, 140.
95. Steck J. L., Kant J. A. (1974). *Methods Enzymol.*, **31**, 172.
96. Thom M., Komar E. (1984). *FEBS Lett.*, **173**, 1.
97. Sze H. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **732**, 596.
98. Sze H. (1985). *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 175.
99. Scherer G. F. E. (1984). *Z. Naturforsch.*, **37C**, 550.
100. Scherer G. F. E., Morré D. J. (1978). *Plant Physiol.*, **62**, 933.

101. *Laties G. G.* (1974). *Methods Enzymol.*, **31**, 589.
102. *Leaver C. J., Hack E., Forde B. G.* (1983). *Methods Enzymol.*, **97**, 476.
103. *Moore A. L., Proudlove M. O.* (1983). In: *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells*. Hall J. L., Moore A. L. (eds.), Academic Press, New York/London, p. 153.
104. *Jackson C., Moore A. L.* (1979). In: *Plant Organelles. Methodological Surveys B. Biochemistry*, Reid E. (ed.), Ellis Horwood, Chichester, Vol. 9, p. 173.
105. *Tolbert N. E.* (1974). *Methods Enzymol.*, **31**, 734.
106. *Day D. A., Hanson J. B.* (1977). *Plant Sci. Lett.*, **11**, 99.
107. *Gardeström P., Edwards G. E.* (1963). *Plant Physiol.*, **74**, 24.
108. *Jackson C., Dench J. E., Hall D., Moore A. L.* (1979). *Plant Physiol.*, **64**, 150.
109. *Goldstein A. H., Anderson J. O., McDaniel R. G.* (1980). *Plant Physiol.*, **66**, 488.
110. *Goldstein A. H., Anderson J. O., McDaniel R. G.* (1981). *Plant Physiol.*, **67**, 594.
111. *Hrubec T. C., Robinson J. M., Donaldson R. P.* (1985). *Plant Physiol.*, **77**, 1010.
112. *Koepe D. E., Cox J. R., Gruenwald P. J.* (1978). In: *Plant Mitochondria*. Duce G., Lance C. (eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 419.
113. *Solomos T., Malhora S. S., Spencer W.* (1973). *Plant Physiol.*, **59**, 807.
114. *Pitt D., Galpin M.* (1973). *Plant Physiol.*, **109**, 233.
115. *Larsson C., Andersson B.* (1979). In: *Plant Organelles. Methodological Surveys B. Biochemistry*. Reid E. (ed.), Ellis Horwood, Chichester, Vol. 9, p. 35.
116. *Fisher D.* (1981). *Biochem. J.*, **196**, 1.
117. *Bergman A., Gardeström P., Ericson I.* (1980). *Plant Physiol.*, **66**, 442.
118. *Gardeström P., Bergman A., Ericson I., Sahlström S.* (1981). In: *Proceedings of the 5th International Congress on Photosynthesis*. Akoyunoglou G. (ed.), p. 633.
119. *Gardeström P., Bergman A., Ericson I.* (1980). *Plant Physiol.*, **65**, 389.
120. *Sun I., Crane F. L.* (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 417.
121. *Bowles D. J., Schnierrenberger G., Kauss H.* (1976). *Biochem. J.*, **160**, 375.
122. *Møller I. M., Bergman A., Gardeström P., Ericson I., Palmer J. M.* (1981). *FEBS Lett.*, **126**, 13.
123. *Lord J. M., Kasagawa T., Moore T. S., Beevers H.* (1973). *J. Cell Biol.*, **57**, 659.
124. *Williamson F. A., Morré D. J., Jaffee M. J.* (1975). *Plant Physiol.*, **56**, 738.
125. *Buckhout T. J., Heyder-Caspers L., Sievers A.* (1982). *Planta*, **156**, 108.
126. *Buckhout T. J.* (1983). *Planta*, **159**, 84.
127. *Lord J. M.* (1983). In: *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells*. Hall J. L., Moore A. L. (eds.), Academic Press, New York/London, p. 119.
128. *Bowden L., Lord T. M.* (1975). *FEBS Lett.*, **49**, 369.
129. *Montague M. J., Ray P. M.* (1977). *Plant Physiol.*, **59**, 225.
130. *Creek K. E., Morré D. J., Silverman-Jones C. S., Shidoji Y., De Luca L. M.* (1983). *Biochem. J.*, **210**, 541.
131. *Schnepf E.* (1972). *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **163**, 113.
132. *DePierre J. W., Dallner G.* (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 411.
133. *Chanson A., McNaughton E., Taiz L.* (1984). *Plant Physiol.*, **76**, 498.
134. *Chanson A., Taiz L.* (1985). *Plant Physiol.*, **78**, 232.
135. *Nagahashi J., Kane A. P.* (1982). *Protoplasma*, **112**, 167.
136. *VanDerWoude W. J., Morré D. J., Bracker C. E.* (1971). *J. Cell Sci.*, **8**, 331.

137. Engles F. M. (1973). *Acta Bot. Neerl.*, **22**, 6.
138. Engles F. M. (1974). *Acta Bot. Neerl.*, **23**, 81.
139. Hespler J. P. F. G., Veerkamp J. H., Sassen M. M. A. (1977). *Planta*, **133**, 303.
140. Hespler J. O. F. G. (1981). *Acta Bot. Neerl.*, **30**, 1.
141. Ray P. M., Eisinger W. R., Robinson D. G. (1976). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **89**, 121.
142. Taiz L., Murry M., Robinson D. G. (198). *Planta*, **758**, 34.
143. Binari L. W., Racusen R. N. (1983). *Plant Physiol.*, **76**, 26.
144. Leegood R. C., Walker H. (1983). In: *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells*. Hall J. L., Moore A. L. (eds.), Academic Press, New York/London, p. 185.
145. Rocha V., Ting I. P. (1970). *Arch. Biochem. Biophys.*, **140**, 398.
146. Mifflin B. J., Beevers H. (1974). *Plant Physiol.*, **53**, 870.
147. Leech R. M. (1964). *Biochim. Biophys. Acta.*, **79**, 637.
148. Morgenthaler J.-J., Price C. A., Robinson J. M., Gibbs M. (1974). *Plant Physiol.*, **54**, 532.
149. Mills W. F., Joy K. W. (1980). *Planta*, **148**, 75.
150. Mouriaux G., Douce R. (1981). *Plant Physiol.*, **67**, 470.
151. Bertrams M., Wrage K., Heinz E. (1981). *Z. Naturforsch.*, **36**, 62.
152. Takabe T., Nishimura M., Akazawa T. (1979). *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2137.
153. Klofat V. W., Hannig K. (1967). *Z. Physiol. Chem.*, **348**, 739.
154. Dubacq J.-P., Kader J.-C. (1978). *Plant Physiol.*, **61**, 465.
155. Larsson C., Albertsson P.-A. (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, **245**, 425.
156. Larsson C., Andersson B., Roos G. (1977). *Plant. Sci. Lett.*, **8**, 291.
157. Reusink A. W. (1978). *Physiol. Plant.*, **44**, 48.
158. Webb M. S., Williams J. P. (1984). *Plant Cell Physiol.*, **25**, 1541.
159. Webb M. S., Williams J. P. (1984). *Plant Cell Physiol.*, **25**, 1551.
160. Morris P., Linstead P., Thain J. F. (1981). *J. Exp. Bot.*, **32**, 801.
161. Walker D. A. (1980). *Methods Enzymol.*, **69**, 94.
162. Arnon D. I. (1949). *Plant Physiol.*, **24**, 1.
163. Reeves S. G., Hall D. O. (1980). *Methods Enzymol.*, **69**, 85.
164. Andersson B., Sundby C., Akerlund H.-E., Albertsson P.-A. (1985). *Physiol. Plant.*, **65**, 322.
165. Mackender R. O., Leech R. M. (1970). *Nature*, **228**, 1347.
166. Block M. A., Dorne A.-T., Joyard J., Douce R. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 13272.
167. Poincelot R. P. (1980). *Methods Enzymol.*, **69**, 121.
168. Douce R., Joyard J. (1979). *Adv. Bot. Res.*, **7**, 1.
169. Haas R., Siebertz H. P., Wrage K., Heinz E. (1980). *Planta*, **148**, 238.
170. Cline K., Andrews J., Mersey N., Newcomb E. H., Keegstra K. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3595.
171. Douce R., Joyard J. (1982). In: *Methods in Chloroplast Molecular Biology*. Edelman M., Hallick R., Chua H.-H. (eds.), Elsevier, Amsterdam, New York, p. 239.
172. Keegstra K., Yousif A. E. (1986). *Methods Enzymol.*, **119**.
173. Sandelius A. S., Selstam E. (1984). *Plant Physiol.*, **76**, 1041.
174. Bahl J. (1977). *Planta*, **136**, 21.
175. Wellburn A. R., Hampp R. (1979). *Biochem. Biophys. Acta*, **547**, 380.
176. Lutz C. (1978). In: *Chloroplast Developments*. Akoyunoglou G., Argyroudi-Akoyunoglou J. H. (eds.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, p. 481.
177. Ryberg M., Sundqvist C. (1982). *Physiol. Plant.*, **56**, 125.
178. MacDonald F. D., ap Rees T. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **755**, 81.
179. Macherel D., Viale A., Akazawa T. (1986). *Plant Physiol.*, **80**, 1041.
180. Echeverria E., Boyer C., Liu K.-C., Shannon J. (1985). *Plant Physiol.*, **77**, 513.

181. *Emes M., England S.* (1986). *Planta*, **168**, 161.
182. *Liedvogel B., Sittler P., Falk H.* (1976). *Cytobiology*, **12**, 155.
183. *Leidvogel B., Kleinig H.* (1976). *Planta*, **129**, 19.
184. *Kreutz K., Beyer P., Kleinig H.* (1982). *Planta*, **154**, 66.
185. *Liedvogel B., Kleinig H., Thompson J. A., Falk H.* (1978). *Planta*, **191**, 303.
186. *Camara B., Bardat F., Moneger R.* (1982). *Eur. J. Biochem.*, **127**, 255.
187. *Iwatsuki N., Moriyama R., Asahi T.* (1984). *Plant Cell Physiol.*, **25**, 763.
188. *Steinmuller D., Tevini M.* (1985). *Planta*, **163**, 201.
189. *Hansmann P., Sittler P.* (1982). *Plant Cell Reports*, **1**, 111.
190. *Tevini M., Steinmuller K.* (1985). *Planta*, **163**, 91.
191. *Dahlin C., Ryberg H.* (1986). *Physiol. Plant.*, **68**, 39.
192. *Kuehl L.* (1964). *Z. Naturforsch.*, **19b**, 525.
193. *Dunham V. L., Bryant J. A.* (1983). In: *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells*, Hall J. L., Moore A. L. (eds.), Academic Press, New York and London, p. 237.
194. *Franke W. W.* (1974). *Phil. Trans. Ry. Soc. London B*, **268**, 67.
195. *Franke W. W.* (1966). *J. Cell Biol.*, **31**, 619.
196. *Lin C.-Y., Guilfoyle T. J., Chen Y. M., Key J. L.* (1975). *Plant Physiol.*, **56**, 850.
197. *Vigil E. L.* (1973). *Sub Cell Biochem.*, **2**, 237.
198. *Tolbert N. E.* (1980). In: *The Biochemistry of Plants*. Stumpf P. K., Conn E. E. (eds.), Academic Press, New York, p. 359.
199. *Mettler I. J., Beevers H.* (1980). *Plant Physiol.*, **66**, 555.
200. *Huang A. H. C., Trelease R. N., Moore T. S. Jr.* (1983). *Plant Peroxisomes*. Academic Press, New York.
201. *Baker A. L., Tolbert N. E.* (1966). *Methods Enzymol.*, **9**, 338.
202. *Tolbert N. E., Oeser A., Kisaki T., Hageman R. H., Yamazaki R. K.* (1968). *J. Biol. Chem.*, **243**, 5179.
203. *Cooper T. G., Beevers H.* (1969). *J. Biol. Chem.*, **244**, 3507.
204. *Cooper T. G., Beevers H.* (1969). *J. Biol. Chem.*, **244**, 3514.
205. *Newcomb E. H.* (1980). In: *Coated Vesicles*. Ockleford C. D., Whyte A. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 55.
206. *Tanchak M. A., Griffing L. R., Mersey B. G., Fowke L. C.* (1984). *Planta*, **162**, 481.
207. *Joachim S., Robinson D. G.* (1984). *Eur. J. Cell Biol.*, **34**, 212.
208. *Mersey B. G., Griffing L. R., Rennie P. J., Fowke L. C.* (1985). *Planta*, **163**, 317.
209. *Griffing L. R., Mersey B. G., Fowke L. C.* (1986). *Planta*, **167**, 175.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАН

*Элейн М. Бейлез, Питер Дж. Ричардсон,
Дж. Пол Лузио*

1. Введение

Иммунологические методы широко используются для исследования структуры и функций мембран. Развитию этих методов способствовала возможность получения специфических антител к мембранным антигенам даже в тех случаях, когда эти антигены не удавалось получить в чистом виде или охарактеризовать. В настоящее время иммунологические методы широко используются для идентификации мембранных компонентов, их локализации, оценки количества, топографического анализа и выделения. Антитела применяются для выделения фракций мембран, для воздействия на те или иные биологические функции компонентов мембран, а также в качестве специфических проб при молекулярном клонировании кДНК, кодирующей мембранные белки. Мы не стремились описать все известные методики выявления антигенов клеточной поверхности или привести полную информацию о разнообразных методах и подходах, позволяющих визуализировать комплексы антиген — антитело с помощью световой и электронной микроскопии. Наша задача состояла в том, чтобы обсудить достоинства и недостатки поликлональных или моноклональных антител к различным компонентам мембран, а также указать на практические моменты получения и использования этих антител для иммуноблоттинга, выделения мембранных фракций или связанных с мембранами макромолекул, а также в качестве проб для молекулярного клонирования.

2. Получение поликлональных и моноклональных антител к компонентам мембран

2.1. Достоинства и недостатки поликлональных и моноклональных антител

Антитела широко используются в качестве инструмента во многих биологических исследованиях, и тем не менее зачастую бывает трудно или даже невозможно предопределить их свойст-

ва. Обычные поликлональные антисыворотки содержат антитела с разной специфичностью и сродством, а также антитела разных классов и типов. Кроме того, если использованный антиген содержит примеси, то поликлональные антисыворотки будут скорее всего включать антитела ко всем компонентам иммуногена. Даже при самых благоприятных условиях специфические антитела вряд ли будут составлять более 5% от общего количества иммуноглобулинов сыворотки; правда, при наличии очищенного антигена можно получить специфические антитела с помощью аффинной хроматографии.

Моноклональные антитела удается получить в виде чистого химического реагента, даже если имеющийся в наличии антиген не свободен от примесей. Как мы увидим, моноклональные антитела чрезвычайно полезны при иммуноаффинной очистке многих минорных мембранных белков. Большинство получаемых моноклональных антител имеют низкую аффинность ($K_a < 0,5 \text{ нМ}^{-1}$ [1]. Низкоаффинные антитела могут применяться для самых разных целей (в частности, для получения очищенных компонентов иммуноаффинными методами); высокоаффинные же моноклональные антитела или поликлональные антитела с высокой авидностью, очищенные методом аффинной хроматографии, по-видимому, наиболее целесообразно использовать для иммуноаффинной очистки фракций мембран, иммуноблоттинга, а также в качестве проб при молекулярном клонировании. В некоторых случаях поликлональные антитела оказываются предпочтительными, поскольку они узнают более чем один антигенный участок (эпитоп) на интересующей исследователя макромолекуле. Моноклональные же антитела по определению узнают только один тип эпитопов, хотя конкретный эпитоп может встречаться более одного раза в составе антигена; примером такого рода служит димер мембранного фермента 5-нуклеотидазы [2].

Участки белковых молекул, определяющие их иммуногенность, стали в последние годы предметом всестороннего изучения. Особый интерес представляют работы Атасси и др. [3]. Эти и другие исследователи показали, что поликлональные сыворотки к природным белкам содержат антитела только к определенным участкам белковых молекул. Получены перекрывающиеся пептидные фрагменты, содержащие полные последовательности лизоцима, миоглобина, гемоглобина и бычьего сывороточного альбумина, и показано, что ограниченное число фрагментов могут абсорбировать все антитела из поликлональной сыворотки, полученной к интактным молекулам. Эпитопы были разбиты на две группы: «секвенциальные», представляющие собой одиночную первичную последовательность аминокислот (именно такие эпитопы обнаруживаются для всех пяти

антигенных участков миоглобина), и «конформационные» эпитопы, образованные несколькими отдаленными друг от друга участками аминокислотной последовательности, сближенными при образовании вторичной или третичной структуры (примером могут служить три антигенных участка лизоцима). Оба типа эпитопов, обычно встречающиеся по одному на каждые 5—10 кДа, располагаются на поверхности белковых глобул, иногда в выступающих петлях. Эпитопы имеют небольшой размер; как правило, они включают 6—7 аминокислотных остатков на поверхности белка и не обязательно являются наиболее гидрофильными участками молекул. Лернер и др. [4] разработали альтернативный подход к определению эпитопов на поверхности белков. Возможно, с его помощью удастся получать антители с заданной специфичностью, используя для этого химически синтезированные пептиды. Получены антисыворотки к синтетическим пептидам с перекрывающимися последовательностями, отвечающим полной аминокислотной последовательности гемагглютиниона вируса гриппа (HA1), 18 из 20 таких сывороток реагировали с интактным природным белком. Анализ структуры этого гемагглютиниона показывает, что определенная часть каждого иммунореактивного пептида располагается на поверхности интактной молекулы. В целом антигенные свойства данного участка белковой молекулы, вероятно, определяются его доступностью, гидрофильностью и мобильностью [5].

Поликлональные антисыворотки образуются в результате сложной последовательности событий в иммунной системе, в том числе супрессии клонов лимфоцитов, продуцирующих антители к некоторым участкам иммуногена. Поскольку при получении моноклональных антител происходит иммортализация соответствующих клонов на определенной стадии развития, могут образовываться антители к самым неожиданным участкам антигена, отсутствующие в поликлональных антисыворотках. Анализ моноклональных антител, продуцирующихся на различных стадиях формирования иммунного ответа [6], может наметить подходы к повышению эффективности получения антител определенной аффинности и специфичности.

2.2. Иммунизация животных для получения поликлональных антител

Какой-либо универсальной методики иммунизации, с помощью которой для всех антигенов можно было бы получать антисыворотки с высокими титрами, не существует. Описаны самые разнообразные методы иммунизации, однако сравнительный их анализ не проводился. Прежде чем приступать к иммунизации животных препаратами мембран или макромолекул,

входящих в их состав, следует обратиться к учебникам по общей практической иммунологии; это поможет выбрать схему иммунизации [7] и установить, насколько необходимо использование адъюванта [8]. Возможно, мембранные белки придется солиubilизировать с помощью детергента, однако избыток детергента иногда мешает образованию эмульсии с адъювантом. Вместо солиubilизированных белков для иммунизации можно использовать кусочки гелей, содержащих белки после электрофореза в ПААГ с ДСН [9]; впрочем, белки из этих гелей можно предварительно извлечь с помощью электрооэлюции (гл. 6). Для иммунизации иногда используют даже полоски нитроцеллюлозы после блоттинга [10]. Очень трудной задачей оказалось получение антител к липидным антигенам, причем большинство хороших сывороток содержат антитела в первую очередь к углеводной части гликолипидов [11]. Для получения антисывороток использовали разные схемы иммунизации, в частности иммунизацию целой мембранной фракцией [12], целыми клетками [13] или очищенными гликолипидами, эмульгированными с белками [14, 15].

В нашей лаборатории при использовании в качестве иммуногенов мембранных белков мы обычно иммунизируем кроликов, морских свинок или овец путем внутривенного введения во многих точках 10—100 мкг белка на животное при каждой первичной или вторичной иммунизации. При первом введении антигена применяется полный адъювант Фрейнда, а при бустерных иммунизациях — неполный. Интервал между иммунизациями должен быть не менее 6 нед; кровь у животных берут через 10 сут после второй и последующих иммунизаций. Собранной крови дают свернуться, сыворотку отделяют центрифугированием, а затем инкубируют в течение 45 мин при 56 °С, если необходимо инактивировать комплемент. Иммуноглобулиновую фракцию получают путем высаливания и хроматографии на колонках, как это описано в различных руководствах (см., например, работу [16]), или с помощью иммобилизованного на сефарозе белка А [17].

2.3. Получение моноклональных антител

Моноклональные антитела получают иммортализацией индивидуальных В-лимфоцитов, продуцирующих антитела, путем слияния с миеломными клетками соответствующих линий. Образующиеся гибридные клетки сохраняют характерную для миеломы способность к росту и секретируют антитела, кодируемые геном лимфоцита. Таким образом удается получить перманентный источник антител определенной специфичности [18].

Принципы и процедуры получения моноклональных антител

изложены в работах [19, 20]. В рамках этой главы мы можем дать только краткое описание основных экспериментальных подходов, используемых в нашей лаборатории (табл. 3.1). Мы осуществляем слияние клеток селезенки иммунизированных животных с клетками миеломы, используя 50%-ный полиэтиленгликоль, а затем помещаем клетки в среду, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда ГАТ). Аминоптерин, являясь антагонистом фолиевой кислоты, блокирует синтез нуклеотидов *de novo*, а для функционирования альтернативного «запасного» метаболического пути необходимы гипоксантин и тимидин; клетки миеломы, используемые для слияния, не содержат основного фермента, необходимого на этом пути, — гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы — и погибают в среде ГАТ. Спленоциты имеют этот фермент, но не растут в культуре. Поэтому в среде ГАТ могут расти только гибридные клетки. Обычное слияние, при котором берут $2 \cdot 10^7$ клеток миеломы и $2 \cdot 10^8$ спленоцитов, позволяет получить около 10^3 гибридных клеточных линий. Гибридные клетки примерно в течение недели выращивают в культуре перед тем, как тестировать культуральную среду на присутствие антител нужной специфичности. Избранные для дальнейшей работы клеточные линии после этого дважды клонируют, применяя обычно метод предельных разведений, и исходные культуры замораживают. Препаративные количества антител получают культивацией клеток в виде асцитной опухоли в животных соответствующих линий. Антитела выделяют из асцитной жидкости осаждением сульфатом аммония и последующей ионообменной хроматографией [16]. Метод, использующийся для получения моноклональных антител в нашей лаборатории, подробно описан в табл. 3.1.

2.4. Скрининг моноклональных антител

Обязательным условием успешного получения моноклональных антител является наличие хорошего метода скрининга. Выбранный метод или комплекс методов должен обладать чувствительностью, достаточной для выявления соответствующих антител в концентрациях менее 1 мкг/мл в объеме культуральной среды 50—100 мкл. В результате одного слияния получают от 100 до 400 лунок для тестирования в зависимости от того, распределяли ли клетки после слияния по четырем пластинам с 24 лунками в каждой или по четырем пластинам с 96 лунками. Если применять пластины с 24 лунками, то мы получим 1—2 мл культуральной среды для тестирования на лунку, но при этом следует иметь в виду, что отрицательные клоны, которые растут быстрее, могут перерасти медленно растущие позитивные клоны. При скрининге на пластинах с 96 лунками для экономии

Таблица 3.1. Получение моноклональных антител к мембранным белкам

А. Схема иммунизации

Готовят эмульсию антигена в полном адьюванте Фрейнда и вводят внутрикожно 1—100 мкг белка на животное при общем объеме вводимой жидкости 0,2—0,5 мл на мышь и до 1 мл на крысу. Миеломы мышей были получены от линии BALB/c, а миеломы крыс — от линии Лоу. Чтобы использовать для иммунизации животных других линий, необходимо выращивать соответствующих гибридных животных для получения асцитных жидкостей. Количество вводимого антигена зависит от степени его очистки, и для чистого препарата достаточно 10 мкг белка. Если для иммунизации используются целые клетки, их отмывают от содержащей белки среды и вводят внутрибрюшинно ($0,5 \cdot 10^6$ — $1 \cdot 10^7$ клеток в 0,5—1,0 мл солевого раствора).

Через 3—4 нед можно провести дополнительную иммунизацию антигеном в неполном адьюванте Фрейнда, но во многих случаях удовлетворительный иммунный ответ удается получить после бустерного введения антигена в солевом растворе через 6—8 нед после первичной иммунизации. При бустерном введении антигена мышам его можно инъецировать внутрибрюшинно или внутривенно, а для крыс приемлем только последний вариант. Через трое суток после бустерной инъекции антигена животных тестируют на присутствие в сыворотке специфических антител, с тем чтобы отобрать особей, клетки крови которых будут использованы для слияния; его проводят на следующий день. Порции крови объемом 100—200 мкл можно получить, отрезав острым скальпелем или бритвой кончик хвоста у животного (под легкой анестезией).

Б. Культуральные среды

1. Клетки миеломы и гибридомы культивируют при 37 °C в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей инактивированную нагреванием сыворотку плода коровы (СПК). Для хорошо стабилизировавшихся гибридомных или миеломных клеток достаточно присутствия в среде 5—10% СПК (DMEM 5 — DMEM 10), но в случае свежеприготовленных гибридом концентрация СПК должна составлять 20%.
2. Среда ГАТ и ГТ можно купить или приготовить из исходных концентрированных растворов.
100×гипоксантин/тимидин (ГТ): растворяют 136 мг гипоксантина и 39 мг тимидина в 100 мл воды или нагреванием до 70 °C, или добавлением NaOH.
100×аминоптерин (А): 1,76 мг на 100 мл воды.
Оба раствора можно стерилизовать фильтрованием или добавлять в среду перед ее стерилизацией фильтрованием. Среду ГАТ (она содержит 5 мл 100×ГТ и 5 мл 100×А на 500 мл) перед осуществлением слияния следует проверить на способность поддерживать рост гибридных клеток и вызывать гибель клеток миеломы.
3. За сутки до слияния готовят 50%-ный раствор ПЭГ. Для этого автоклавируют 10 г ПЭГ 1500 в течение 20 мин и добавляют 10 мл DMEM (подогретой до 37 °C), пока ПЭГ еще не остыл. В день слияния слегка подщелачивают раствор при встряхивании на воздухе в стерильной камере до тех пор, пока цвет по феноловому красному не станет розово-оранжевым.

В. Клетки миеломы

1. Для одного слияния выращивают $2 \cdot 10^7$ клеток миеломы в среде DMEM 10. Для слияний с мышинными клетками используют линии P3-NS1-Ag4-1 (NS-1) (не продуцирует эндогенных тяжелых цепей), X63/Ag 8.653 или NS 0/1 (не продуцируют эндогенных иммуноглобулиновых цепей). Для слияний с крысинными клетками рекомендуется линия Y3-Ag 1.2.3 (не продуцирует эндогенных тяжелых цепей).

Продолжение

2. Перед слиянием культуры выдерживают в логарифмической фазе роста по меньшей мере одну неделю при концентрации клеток $(10-30) \cdot 10^4/\text{мл}$.

Г. Слияние клеток

1. Животных умерщвляют методом цервикальной дислокации или помещением их в атмосферу CO_2 , затем или протирают спиртом, или погружают в спирт и удаляют селезенку в стерильных условиях. Селезенку помещают в чашку Петри, содержащую 5 мл DMEM 2.
2. Берут максимально возможное количество крови путем пункции сердца. Полученную из крови сыворотку сохраняют для тестирования.
3. От селезенки отделяют соединительную ткань, надрезают капсулу и помещают спленоциты в пробирку с круглым дном; клетки диспергируют в 10 мл DMEM 2, используя гомогенизатор со слабо притертым тефлоновым пестиком.
4. Суспензию переносят в центрифужную пробирку на 30 мл, доводят объем среды до 20 мл и центрифугируют при 600—700 об/мин в течение 7 мин при комнатной температуре.
5. Спленициты ресуспендируют в 21 мл среды DMEM 2, отбирают 1 мл получившейся суспензии и разводят в 19 мл DMEM для подсчета клеток.
6. Спленициты и миеломные клетки осаждают центрифугированием и ресуспендируют $2 \cdot 10^6$ клеток селезенки (~ 1 селезенка мыши или $1/2$ селезенки крысы) и $2 \cdot 10^7$ клеток миеломы вместе в 20 мл DMEM и осаждают еще раз.
7. Тщательно удаляют надосадочную жидкость, затем для диспергирования клеток встряхивают пробирку, постукивая по ней, и помещают в стаканчик с водой при 37°C .
8. Добавляют 1 мл 50%-ного ПЭГ (предварительно подогретого до 37°C) в течение одной минуты с постоянным осторожным перемешиванием клеточного осадка. Встряхивают пробирку в течение 1 мин, добавляют за 1 мин 1 мл DMEM (при 37°C), после чего в течение следующих 5 мин при постоянном встряхивании добавляют еще 19 мл DMEM (при 37°C).
9. Клетки осаждают и осторожно ресуспендируют в 100 мл среды DMEM 20, после чего разливают в четыре пластины с 96 лунками или в четыре пластины с 24 лунками.
10. Клетки выращивают в течение ночи при 37°C в атмосфере увлажненного CO_2 .

Д. Отбор гибридом на среде ГАТ

1. На следующий день удаляют половину культуральной жидкости и заменяют таким же объемом среды ГАТ, содержащей 20% СПК.
2. Эту процедуру повторяют в течение еще двух дней. За это время погибает большинство клеток.
3. Через неделю должен быть четко виден рост гибридом, и можно тестировать культуральные среды на присутствие специфических антител.

Аминоптерин является очень эффективным ингибитором ферментов, поэтому гибридому не следует переносить сразу же в DMEM-20 после того, как в селективной среде ГАТ погибли все не слившиеся со спленоцитами миеломные клетки. Чтобы перевести клетки из среды ГАТ, их вначале выдерживают в среде ГТ.

Е. Клонирование

Отобранные при скрининге клетки переносят на пластины с 24 лунками, выращивают до большой плотности и клонируют методом предельных разведений или в полужидком агаре. Для линий крысиных клеток предпочтительно клонирование в агаре, а для большинства мышиных линий удовлетворительные результаты дает метод предельных разведений.

I. Метод предельных разведений

Для клонирования этим методом необходимо использовать фидерные клетки, способствующие поддержанию роста гибридных клеток при низких концентрациях.

1. Готовят суспензию спленоцитов неммунизированных животных (см. разд. «Слияние клеток») в 20 мл среды DMEM 20 на одну селезенку мыши или готовят суспензию перитонеальных макрофагов, промывая брюшную полость животного 10 мл DMEM 20.
2. Подсчитывают число гибридных клеток и разводят суспензию до концентрации 10—20 клеток на 1 мл в 20 мл DMEM 20, содержащей ГТ, куда заранее добавлено 2 мл суспензии фидерных клеток; переносят полученную суспензию на пластину с 96 лунками.
3. Через 1 нед пластины просматривают, визуально выявляют рост отдельных колоний и отбирают аликвоты культуральной жидкости из соответствующих лунок для тестирования. Материал из нескольких «позитивных» лунок выращивают, замораживают исходные культуры, а выращенный материал повторно клонируют. Моноклональная клеточная линия при реклонировании будет давать 100% позитивных колоний.

II. Клонирование в полужидком агаре

1. Готовят 1,1%-ный (в/о) агар Difco при подогреве, затем охлаждают и подерживают при температуре 45°C.
2. Добавляют равный объем DMEM 2 (при 45°C) и 1/10 объема СПК.
3. Вносят 2 мл такой среды в чашку Петри диаметром 35 мм и оставляют до затвердения.
4. Готовят шестикратные разведения содержимого позитивных лунок в 1 мл DMEM 10, добавляют 1 мл полужидкого агара и переносят в чашки Петри с застывшим агаром.
5. Выращивают культуру в течение 1 нед в атмосфере увлажненного CO₂, после этого отдельные колонии можно отбирать из агара с помощью пастеровских пипеток и переносить для культивирования в жидкой среде.

Е. Замораживание клеток

1. Клетки в экспоненциальной фазе роста осаждают и ресуспендируют до концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл в охлажденной среде DMEM 20, содержащей 10% ДМСО.
2. Переносят аликвоты по 1 мл в пробирки для замораживания, помещают пробирки в коробку из пенопласта, которую в течение 1 сут выдерживают при температуре -70°C, а затем переносят в жидкий азот.
3. Быстро размораживают содержимое пробирок, погрузив их в водяную баню с температурой 37°C, добавляют 10 мл DMEM 20, осторожно осаждают клетки, ресуспендируют их в нескольких миллилитрах DMEM 20 и культивируют.
4. По одной пробирке из каждой замороженной партии следует использовать в качестве контроля: разморозить ее содержимое и проверить клетки на жизнеспособность и стерильность.

Ж. Получение асцитной жидкости

1. За две или более недель до введения животным клеток, продуцирующих антитела, животных подготавливают: вводят им внутривенно прнстан (тетраметилпентадекан) в количестве 0,5 мл на мышь или 1,5 мл на крысу.
2. Гибридомы берут в экспоненциальной фазе роста из расчета примерно $5 \cdot 10^6$ клеток на животное.
3. Перед введением клеток в брюшную полость их промывают в бессывороточной среде.

Продолжение

4. Через 1—2 нед обычно начинается накопление асцитной жидкости. Выжидают, пока у животных не разовьется сильный отек, а затем умерщвляют их. От мыши получают 5 мл жидкости, а от крысы — 40 мл. Можно также отбирать жидкость через день толстой иглой, вводя ее в брюшную полость. Этим методом получают 15—20 мл асцитной жидкости от каждой мыши.
5. Асцитную жидкость центрифугируют для удаления клеток.

3. Выделение антител из асцитной жидкости

1. К асцитной жидкости добавляют равный объем насыщенного сульфата аммония, и преципитировавший белок осаждают центрифугированием.
2. Осадок растворяют в равном объеме 100 мМ калий-фосфатного буфера, pH 8, и повторяют преципитацию, растворя осадок в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 8.
3. Диализуют полученный раствор против 10 мМ калий-фосфатного буфера и наносят диализат на ионообменную колонку с DE-52, уравновешенную тем же буфером. Антитела содержатся в первом главном пике белка; их можно сконцентрировать фильтрацией на ячейках фирмы Amicon, используя, например, мембрану RM30. Выход антител зависит от используемой клеточной линии, но он не должен быть ниже 5 мг белка на 1 мл асцитной жидкости.
4. Антитела элюируют калий-фосфатным буфером возрастающей концентрации (10—200 мМ).

времени и средств лучше тестировать материал, собранный сразу из четырех или шести лунок, а затем проводить тестирование отдельных лунок из числа тех, материал которых в совокупности дал позитивную реакцию.

Выбор метода тестирования зависит от природы антигена, его количества и степени очистки. Многие методы скрининга, используемые в нашей лаборатории, включают применение иммуносорбента на основе бараньих антител против иммуноглобулинов класса G мыши, иммобилизованных на аминоцеллюлозе (табл. 3.2 и 3.3, Б; рис. 3.1). Для получения этих антител проводили иммунизацию барана моноклональными антителами МОРС 21 класса IgG, секретируемыми гибридомой на основе миеломной линии Р3-Х63/Ag8. Обычно удается достичь уровня связывания 0,3 мг IgG на 1 мг целлюлозы, и 0,25 мг такого иммуносорбента имеет достаточную емкость для связывания всего количества мышинных иммуноглобулинов в 100 мкл культуральной жидкости или в 100 мкл сыворотки мыши при разведении 10^{-3} . Альтернативный подход состоит в сорбции антител к Ig мыши (или крысы) на пластинах с 96 лунками (табл. 3.3, А). Сорбционная способность пластин по крайней мере в 10 раз ниже, чем иммуносорбента на основе целлюлозы, однако сама процедура тестирования более удобна. Когда антиген в достаточной степени очищен и может быть помечен радиоизотопами, любой из названных методов иммобилизации можно использовать в простом тесте связывания антигена (для выбора подходящего варианта теста см. табл. 3.3, Б). Если есть

Таблица 3.2. Приготовление целлюлозных иммуносорбентов

А. Приготовление «аминоцеллюлозы»

1. Растворяют 0,5 г ацетата натрия в 2 мл воды, а 1,4 г *m*-нитробензилоксиметилпиридинхлорида — в 18 мл этанола.
2. Смешивают два этих раствора, добавляют 5 г целлюлозы (ватман СС41) и перемешивают до образования суспензии.
3. Прогревают при 70 °С в чашке Петри до высыхания (~30 мин), затем еще 40 мин при 125 °С.
4. Промывают три раза бензолом (по 200 мл) на воронке со стеклянным фильтром и тщательно отсасывают жидкость. Промывают 1 л воды.
5. Ресуспендируют промытый осадок в 150 мл раствора, содержащего 200 г/л дитионита натрия, и перемешивают при 55–60 °С в течение 30 мин.
6. Промывают три раза водой (по 200 мл) и два раза 30%-ной уксусной кислотой (по 200 мл) и снова водой до тех пор, пока не исчезнет запах H_2S .
7. Полученный материал высушивают в эксикаторе при 20 °С. Если он содержит комки, их растирают в порошок. «Аминоцеллюлозу» хранят в эксикаторе при 4 °С в течение нескольких месяцев.

Б. Приготовление белка

Если используются антитела к иммуноглобулинам из сывороток или асцитных жидкостей, то применяется осаждаемая соответствующей концентрацией сульфата аммония фракция (между 40 и 50 %), которую тщательно диализуют против буфера.

В. Приготовление диазоцеллюлозы

1. Растворяют 1,5 г хлорида меди в минимальном количестве воды (5 мл) до образования раствора зеленого цвета и добавляют в избытке (~75 мл) *свежеприготовленный* 1 М NaOH при постоянном перемешивании.
2. Образовавшийся голубой осадок дважды промывают водой (по 100 мл) на бюхнеровской воронке через два слоя фильтровальной бумаги ватман 41 до тех пор, пока pH промывной жидкости не станет меньше 9 и подсушивают на воронке.
3. Осадок соскребают с фильтра и растворяют в 40 мл свежеприготовленного 0,88 М аммиака (темно-синий цвет) для образования насыщенного раствора. Интенсивно перемешивают не менее 15 мин.
4. Растворяют в 40 мл этого аммиачного раствора гидроксида меди 0,5 г порошкообразной «аминоцеллюлозы». Тщательно перемешивают как минимум 15 мин.
5. Центрифугируют при 5000 *g* в течение 5 мин для удаления избытка гидроксида меди и/или комков «аминоцеллюлозы».
6. Переносят осадок в 1500 мл воды, что дает бледно-голубой раствор. Добавляют 10%-ную H_2SO_4 до тех пор, пока раствор не станет бесцветным или очень слабо окрашенным, а pH не уменьшится до 4. При этом «аминоцеллюлоза» флокулирует с образованием белого преципитата.
7. Дают раствору отстояться в течение 30 мин, а затем тщательно отсасывают воду.
8. Преципитат промывают четыре раза холодной водой (порциями по 100 мл), каждый раз центрифугируя суспензию. Если целлюлоза плохо осаждается при центрифугировании, добавляют одну-две капли 1 М HCl.
9. Охлаждают целлюлозу при 4 °С. При этом она может приобрести розоватую окраску.
10. Ресуспендируют «аминоцеллюлозу» в 50 мл свежеприготовленной холодной 2 М HCl. Добавляют 2 мл 1%-ного (в/о) нитрита натрия и проверяют на наличие свободного окислителя, используя йод-крахмальную бумагу (ватман), которая от окислителей чернеет. Суспензию перемешивают 20 мин

Продолжение

при 4 °С.

11. В смесь добавляют избыток сухой мочевины до тех пор, пока йод-крахмальный тест не даст отрицательную реакцию, а затем промывают при 4 °С три раза водой и два раза 0,2 М боратным буфером¹⁾. Между промывками суспензию центрифугируют.
12. Осадок ресуспендируют в небольшом объеме (25 мл) 0,2 М боратного буфера. Для проверки полноты диазотирования добавляют небольшое количество суспензии к слабому раствору β-нафтола в воде, после чего должна появиться ярко-оранжевая окраска.

Г. Связывание белка

1. Сразу же после приготовления диазоцеллюлозы ее добавляют к равному количеству белка, растворенного в боратном буфере (обычно 100 мг целлюлозы на 100 мг белка). Общий объем смеси составляет ~15 мл.
2. Инкубируют 48 ч при 4 °С в темноте, все время перемешивая.
3. Суспензию центрифугируют и супернатант сохраняют, поскольку его можно снова использовать для связывания белка.
4. Иммуносорбент промывают три раза в 0,2 М боратном буфере.
5. Ресуспендируют иммуносорбент при концентрации 5 мг/мл в 0,2 М боратном буфере.
6. Количество белка, связавшегося с иммуносорбентом, измеряют методом Лоурн. Обычно на 1 мг целлюлозы приходится 200—300 мкг связанного белка.

Получение целлюлозных иммуносорбентов схематически представлено на рис. 3.1.

¹⁾ 0,2 М боратный буфер имеет следующий состав: 12,4 г борной кислоты, 14,9 г KCl на 1 л; pH доводят до 8,2 с помощью NaOH.

возможность заранее связать антиген с радиоактивно меченным лигандом, то нет нужды получать его в очищенном виде [21], но в этом случае мы не выявим антитела к сайту связывания лиганда.

Можно разработать методы скрининга антител к ферментам, не требующие наличия очищенных ферментных препаратов. Антитела, не подавляющие активность фермента или оказывающие лишь частичное ингибирующее действие, можно выявить путем инкубации иммобилизованных антител в разбавленном растворе фермента и последующего добавления после промывания субстратной смеси. Этот метод особенно удобен, когда проводится колориметрический анализ с использованием пластин с 96 лунками, поскольку поглощение можно очень быстро измерить на приборе Titertek Multiscan (фирмы Flow Laboratories). Лунки с положительной реакцией можно выявить еще быстрее визуально. Именно таким образом были выявлены моноклональные антитела к изоферментам щелочной фосфатазы [22, 23].

При тестировании антител желательны не ограничиваться только исследованием действия культуральной среды на антиген, поскольку культуральная среда, содержащая сыворотку

Таблица 3.3. Методы скрининга моноклональных антител к компонентам мембран

А. Методы сенсibilизации пластин с 96 лунками

I. Растворимые белки

1. В каждую лунку заливают по 100 мкл раствора белка с концентрацией 10—100 мкг/мл в буфере, pH которого близок к нейтральному, например PBS (pH 7.5) или 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 6,5), и инкубируют в течение нескольких часов при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Вместо этого можно выпарить раствор в лунках, поместив открытые пластины в ламинарный шкаф на ночь.
2. Раствор белка удаляют и промывают лунки два-три раза буфером (скажем, PBS), содержащим балластный белок, например БСА в концентрации 1—10 мг/мл или желатин в концентрации 5 мг/мл, для блокирования всех мест связывания белка.

II. Мембраны

Мембраны можно использовать для непосредственной сенсibilизации пластин, как это описано для растворимых белков, или связывать их через поли-L-лизин.

1. В каждую лунку вносят 50 мкл раствора поли-L-лизина (Sigma No. P-1399, мол. масса 150—300 кДа) с концентрацией 1—2 мг на 100 мл в буфере (например, PBS, pH 7,5) и инкубируют 1 ч при 37°C.
2. Раствор полилизина удаляют и пластину однократно промывают буфером.
3. Добавляют в лунки по 25 мкл суспензии мембран с концентрацией 60—120 мкг белка/мл и инкубируют в течение 1 ч при 4°C. Мембраны можно также осадить центрифугированием при 1000 g в течение 20 мин при 4°C (например, используя центрифугу Hecus Christ Minifuge GL).
4. Удаляют жидкость из лунок и промывают их буфером.
5. Наполняют лунки буфером, содержащим 1% БСА, для блокирования свободных мест связывания. В таком виде пластину можно хранить при -20°C.

III. Целые клетки

Прикрепляющиеся клетки, например фибробласты, можно выращивать непосредственно на пластинках для скрининга. Если имеется специальная центрифуга для осаждения клеток в пластинах, можно использовать и другие клетки. Для прикрепления клеток применяют также поли-L-лизин — примерно так, как это описано для клеточных мембран. Число клеток на лунку составляет 10^5 — 10^6 . Применяют также фиксацию глутаровым альдегидом, хотя при этом могут разрушаться некоторые антигенные сайты¹⁾.

1. В каждую лунку вносят по 10^6 клеток и центрифугируют пластину (100 g, 5 мин).
2. Осторожно погружают пластину в стакан на 1 л, содержащий свежеприготовленный 0,25%-ный глутаровый альдегид в PBS при 4°C, и инкубируют 5 мин.
3. Промывают пластину в PBS, содержащем 1 мг/мл БСА.

IV. Гликолипиды

Пластины можно сенсibilизировать гликолипидами, внося их в лунки в летучих растворителях, например в метаноле или этаноле. Растворитель испаряют на воздухе или в потоке азота, а затем пластины промывают забуференным раствором белка для блокирования свободных мест связывания.

Б. Методы тестирования

I. Меченые антитела и сенсibilизированные антигеном пластины

1. Пластины на 96 лунок сенсibilизируют антигеном, как это описано в разд. А.

Продолжение

2. В лунки вносят 50—100 мкл культуральной среды с добавлением 50 мкл буфера, содержащего не менее 1 мг/мл БСА, и инкубируют 1 ч при комнатной температуре.
3. Огмывают пластины 2—3 раза буфером.
4. Пластины инкубируют с мечеными антителами к иммуноглобулинам, например с ^{125}I -антителами (10 000 имп./мин на лунку) или с антителами, конъюгированными с ферментом в течение 1 ч при комнатной температуре.
5. Промывают пластины три раза буфером.
6. Вырезают лунки для определения связанной радиоактивности или добавляют в них набор реагентов для определения ферментативной активности; лунки, дающие позитивную реакцию, выявляют визуально или с помощью спектрофотометра Multiscan.

II. Радиоактивно меченный антиген и пластины, сенсибилизированные глобулинами

1. Иодируют белок так, чтобы на моль антигена приходилось ≤ 1 моля включенного ^{125}I . Разбавляют до 200 000 имп./мин на 1 мл в соответствующем буфере, содержащем >1 мг/мл БСА и подходящий детергент, например 0.1%-ный тритон X-100.
2. Инкубируют 50—100 мкл культуральной жидкости и 50 мкл буфера, содержащего >1 мг/мл БСА и соответствующий детергент, в лунках пластин, сенсибилизированных антителами барана к иммуноглобулинам мыши (или крысы) в течение 1 ч при комнатной температуре.
3. Пластины промывают два раза буфером, удаляя жидкость отсасыванием или энергичным стряхиванием.
4. Добавляют 100 мкл пробы антигена, меченого и подготовленного в соответствии с п. 1. Инкубируют 1—4 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C.
5. Дважды промывают пластины, вырезают лунки и определяют связанную радиоактивность на гамма-счетчике.

III. Радиоактивно меченный антиген и целлюлозный иммуносорбент

1. Иодируют белок, включив ≤ 1 моля ^{125}I на 1 моль антигена. Разбавляют до 200 000 имп./мин на 1 мл в соответствующем буфере, содержащем >1 мг/мл БСА и подходящий для мембранного белка детергент. Разливают порциями по 100 мкл.
2. Инкубируют со 100 мкл культуральной жидкости в течение 1—4 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C.
3. Добавляют 50 мкл целлюлозного иммуносорбента со связанными бараными антителами к иммуноглобулинам мыши (крысы) с концентрацией белка 5 мг/мл и инкубируют 1 ч при комнатной температуре.
4. Дважды промывают иммуносорбент 2 мл инкубационного буфера, осаждая его центрифугированием. Сливают надосадочную жидкость и измеряют связанную с иммуносорбентом радиоактивность. Радиоактивность контрольных образцов не должна превышать 100 имп./мин. Более высокий уровень связывания в контроле может указывать на агрегацию антигена; в этих случаях следует попытаться использовать другие детергенты и/или более высокие концентрации солей в буфере.

¹⁾ См. работу [20].

плода коровы и обломки клеток, может оказывать неспецифическое действие на компоненты системы. Например, при получении моноклональных антител к 5'-нуклеотидазе печени крыс мы обнаружили, что культуральная среда оказывает ингибирующее

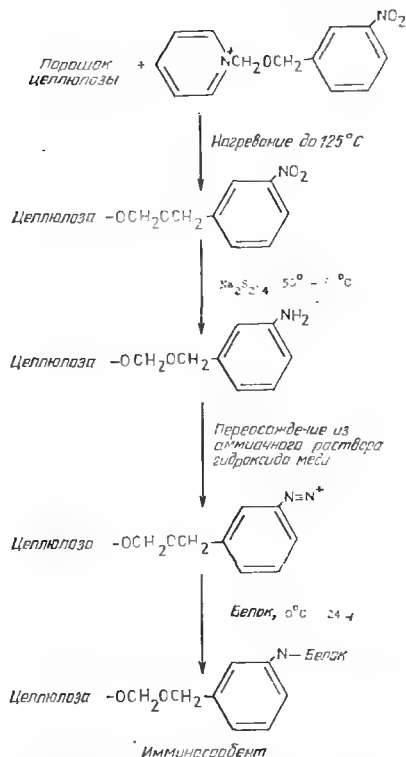


Рис. 3.1. Общая схема приготовления иммуносорбента на основе целлюлозы. Детальное описание приведено в Приложении II.

действие на 5'-нуклеотидазу, хотя дело было в метаболизме определяемого компонента системы [³H]-аденозина под действием ферментов цитозоля; этот эффект удалось устранить добавлением в субстратную смесь избытка «холодного» (немеченого) аденозина (Bailey, 1979, неопубликованные данные). Антитела, как оказывающие действие на данный фермент, так и не оказывающие подобного действия, можно выявлять путем удаления фермента из раствора с помощью комплекса иммуносорбент/моноклональное антитело. Этот метод применим для любого антигена, для выявления которого имеется специфический тест.

В качестве основного метода, альтернативного всем описанным выше, используется следующий тест: твердофазный носитель, например пластину с 96 лунками, сенсibilизируют антигеном, инкубируют со средой, в которой выращивались клетки, а затем добавляют меченые антитела к иммуноглобу-

линам мыши или крысы или меченый белок А. Однако этот метод требует больших количеств очищенного антигена. Кроме того, солиблизированные мембранные антигены могут плохо связываться с поверхностью лунок из-за присутствия детергентов, блокирующих адсорбцию [20]. Например, обнаружено, что плацентарная щелочная фосфатаза плохо связывается с поверхностью пластин, и удовлетворительные результаты при тестировании были получены только после предварительной сенсibilизации лунок кроличьими антителами против плацентарной щелочной фосфатазы [24]. На пластины можно также сорбировать клеточные мембраны, целые клетки и гликолипиды (табл. 3.3). Тесты с применением целых клеток следует проводить при температуре ниже 4°C, чтобы предотвратить эндоцитоз или захват антител мембранами.

Определяемый реагент может быть связан с ферментной системой (пероксидазой, щелочной фосфатазой или β -галактозидазой) или помечен радиоактивным изотопом. Иммуоферментные определения менее трудоемки, чем радиоиммунные: в результате ферментативных реакций образуются окрашенные продукты, количество которых легко измерить с помощью прибора типа Multiscan, в то время как при радиоиммунных определениях приходится вырезать каждую из лунок и по отдельности измерять их радиоактивность. Однако присутствие эндогенной ферментативной активности в неочищенных препаратах мембран или клеток может мешать иммуоферментному определению, что ограничивает возможность применения тестов этого типа.

При радиоиммунных определениях в качестве меченого реагента можно использовать иодированный белок А или иодированные антитела против Ig мыши или крысы. Крысиный IgG, а также мышинные IgM и IgG₁ вообще не реагируют с белком А или реагируют очень слабо [20], поэтому, вероятно, лучше использовать меченные иодом антитела против иммуноглобулинов мыши или крысы.

Существует также иммуофлуоресцентная методика с использованием флуоресцентного клеточного сортера [20]; ее используют для выявления антител против субпопуляций клеток или в тестах на цитотоксичность [25] для определения комплексообразующих антител против антигенов клеточной поверхности. Однако рассмотрение данного метода выходит за рамки этой главы.

3. Иммуоблоттинг и анализ эпитопов

Возможности иммунологического анализа мембранных белков были существенно расширены благодаря использованию электрофореза в полиакриламидных гелях в присутствии ДСН с перенесением разделенных белков на нитроцеллюлозные фильтры для последующего выявления с помощью антител. Этот метод, называемый иммуоблоттингом или вестерн-блоттингом [26, 27], с успехом заменил ранее разработанные методы иммунологического изучения белков, разделенных с помощью электрофореза в геле, например встречный иммуоэлектрофорез [28]. Его использование не требует диффузии антител в гель или преципитации иммунных комплексов. Вместо этого белки электрофоретически переносят и иммобилизуют на поверхности фильтра, и используемые для анализа антитела имеют прямой доступ к ним. При этом сохраняется такое же разрешение, как и при электрофорезе в ПААГ с ДСН, а кроме того, повышается чувствительность: используя высокие титры антител, удается выявлять менее 1 нг мембранных белков. Методические аспекты

Таблица 3.4. Иммуноблоттинг мембранных белков

А. Гель-электрофорез

Для электрофореза можно использовать самые разные гели и буферные системы. Хорошие результаты при переносе на нитроцеллюлозу получаются на самом деле при любой стандартной процедуре электрофореза в пластинах ПААГ с ДСН при концентрации полиакриламида $\leq 12\%$ (в/о, суммарный мономер).

Б. Перенос

1. Сразу после завершения электрофореза в ПААГ с ДСН формируют «сэндвич» для последующего переноса, состоящий из следующих слоев:
 пластина перфорированной пластмассы
 лист пористой резины (или материала Scotchbrite)
 два листа фильтровальной бумаги ватман 3ММ
 пластина полиакриламидного геля
 лист нитроцеллюлозы (Schleicher and Schull, 0,45 мкм, BA 85, подрезанный по размеру пластины геля)
 два листа фильтровальной бумаги ватман 3ММ
 лист пористой резины (или материала Scotchbrite)
 пластина перфорированной пластмассы.
2. Каждый слой сэндвича смачивают в буфере для переноса и после наложения на предыдущий слой прокатывают круглой стеклянной палочкой для удаления пузырьков воздуха. Для некоторых мембранных белков лучше использовать нитроцеллюлозные фильтры 0,22 мкм, а не 0,45 мкм.
3. Полностью сформированный сэндвич помещают в пластмассовый аппарат для электрофоретического переноса таким образом, чтобы гель располагался со стороны катода, а лист нитроцеллюлозы — со стороны анода. Пригодные для переноса аппараты с источником питания выпускают фирмы BioRad, Richmond, CA, USA или Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA. Емкости для переноса в этих приборах вмещают примерно 3 л буфера для переноса¹⁾.
4. Электрофоретический перенос проводят в течение ночи при комнатной температуре при напряженности поля 6 В/см (расстояние измеряется между электродами), т. е. при напряжении примерно 40 В для прибора фирмы BioRad. Чтобы ускорить перенос, можно использовать аппарат для полусухого переноса (Sartorius GmbH).

В. Окрашивание, блокирование, промывание, инкубация с антителами и проявление

I. Иммунопероксидазное окрашивание

Для визуализации полос, соответствующих стандартным белкам, можно провести окрашивание нитроцеллюлозного фильтра красителем понсо S [0,2% (в/о) в 3%-ной (в/о) ТХУ; Serva] в течение 5 мин с последующим промыванием водой. Положение полос следует отмечать, поскольку окраска исчезает при последующих процедурах.

Фильтр промывают, проводят блокирование и проявляют (см. ниже), используя PBS, содержащий 10% (о/о) лошадиной сыворотки и 0,1% (о/о) тритона X-100 (буфер А), если не указано иное.

1. Фильтр промывают три раза по 15 мин в буфере А.
2. Инкубируют фильтр с первым антителом в течение 50 мин. Лучше всего использовать IgG-фракцию при концентрации 1—20 мкг/мл.
3. Фильтр промывают три раза по 15 мин в буфере А.
4. Инкубируют фильтр с мечеными пероксидазой хрена вторыми антителами в течение 60 мин (используют антитела фирмы TAGO Inc., Burlingame, CA, USA, в разведении 1 : 2000).
5. Промывают фильтр три раза по 15 мин в буфере А.

Продолжение

6. Промывают фильтр два раза по 5 мин в PBS.
 7. Обрабатывают фильтр 0,1 М трис-HCl, pH 7,4, содержащим 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорид в концентрации 0,5 мг/мл и 1:5000 H₂O₂. Объем буфера, используемого для промывания, зависит от размера фильтра и может варьировать от 2 мл для одной дорожки геля до 25 мл для целого фильтра.
- Вместо лошадиной сыворотки в качестве блокирующих агентов можно применять желатин (0,5%, в/о), гемоглобин или сухое молоко.

II. Проявление [¹²⁵I]-белком А

1. Иодируют белок А или используют готовый препарат фирм Amersham Int. или New England Nuclear.
2. Переносят белки на нитроцеллюлозные фильтры и окрашивают в течение 1 мин в 0,3%-ном амидочерном, растворенном в смеси вода:метанол:уксусная кислота (50/40/10). Промывают фильтры в PBS.
3. Инкубируют фильтры с антисывороткой или антителами в PBS, содержащем 1% БСА, в течение 60 мин при 37 °С или в течение ночи при 4 °С. Разведение антител зависит от титра (от 1:20 до 1:1000).
4. Промывают фильтры три раза PBS.
5. Инкубируют фильтры с [¹²⁵I]-белком А (1·10⁶ имп./мин) в течение 45 мин при комнатной температуре.
6. Тщательно промывают фильтры в PBS, содержащем 0,1% тритона X-100, высушивают и экспонируют с пленкой KODAK-X-OMAT AR.

¹⁾ Буфер для переноса содержит 12 г глицина и 2,5 г трис-основания на 1 л. Для улучшения переноса можно добавить метанол, но это не обязательно.

и применение иммуноблоттинга белков рассмотрены в обзорах [29—33]. В большинстве лабораторий разработаны собственные приемы электрофоретического переноса, подходы к выбору фильтров, белковых блокирующих реагентов, условий инкубации с антителами, а также методов регистрации (с использованием радиоактивных изотопов для ферментов). Тем не менее некоторые варианты методик применяются наиболее широко; они и представлены в табл. 3.4.

Разработаны также варианты основного метода иммуноблоттинга, предназначенные для особых целей. Если возникают затруднения при установлении природы белкового антигена в смеси белков после разделения в ПААГ с ДСН или после двумерного электрофореза, то гель можно зафиксировать и окрасить кумасси синим перед электрофоретическим переносом белков на нитроцеллюлозный фильтр. Фиксированные и окрашенные белки выходят из геля медленно, и для их полного переноса нужно проинкубировать гель в течение 2 ч при комнатной температуре в буфере, содержащем ДСН, перед тем, как осуществлять перенос [34]. После переноса на фильтре появляются голубые полосы; инкубация с первым антителом, а затем с меченым пероксидазой вторым антителом и последующая обработка диаминобензидином приводят к появлению коричневой окраски в

том месте, где были голубые полосы; она хорошо видна, если смотреть через синий фильтр.

Еще один метод анализа мембранных белков — это использование иммобилизованных на фильтре белков для иммуноаффинной очистки антител [35]. С помощью этого метода можно определить, содержат ли две белковые полосы в геле одинаковые эпитопы. Для этого нужно элюировать антитела, связанные с одной белковой полосой, и провести реакцию этих антител с материалом второй полосы. Таким образом можно идентифицировать пептиды, образующиеся при протеолизе более крупных белков, а частности в ходе выделения мембран [2].

При иммуноблоттинге можно использовать как поликлональные, так и моноклональные антитела. Однако в последнем случае иногда возникают определенные трудности. Так, эпитопы могут необратимо разрушаться при подготовке образцов к электрофорезу в ПААГ (например, при восстановлении [36]). Считается, что белки связываются с нитроцеллюлозой благодаря гидрофобным взаимодействиям [37], и обычно предполагается, что метод иммуноблоттинга позволяет наружным, более гидрофильным участкам белковых молекул принимать свою нормальную эпитопную конформацию. Фактически белки могут восстанавливать свои функциональные свойства при иммуноблоттинге, как это было показано для 3'-фосфодиэстеразы 2'-3'-циклических нуклеотидов [38], связывания бунгаротоксина ацетилхолиновым рецептором [39], иммунореактивности антител [40] и связывания Ca^{2+} различными белками [41]. Способностью к восстановлению правильной антигенной конформации при блоттинге обладают не только интактные белки, но и некоторые фрагменты белковых молекул, полученные при протеолитическом или химическом расщеплении. Это позволило картировать эпитопы с помощью иммуноблоттинга при взаимодействии и моноклональных, и поликлональных антител со многими белками [42]. Метод дает особенно ценную информацию в том случае, если используются антитела, способные модифицировать функции белков с известной первичной последовательностью, поскольку это позволяет высказать определенные предположения о топографии белков (например, в составе мембран) и об их биологической активности [43].

Разработаны также методы иммуноблоттинга гликолипидных антигенов. В этом случае гликолипиды разделяют с помощью ТСХ, а затем переносят на нитроцеллюлозу [44]. Гликолипидные антигены можно выявлять и непосредственно на пластинах после иммобилизации с использованием полиизобутилметакрилата [45, 46].

Таблица 3.5. Иммуноаффинная очистка субклеточных фракций

Органелла	Тип клеток/ткань	Эффективность адсорбции ¹⁾	Ссылка
Плазматические мембраны	Адиipoциты, гепатоциты	8,8	[49, 53, 54]
Домены плазматических мембран	Клетки печени, почек	14,6	[55, 56]
Везикулы с правильной или обратной (вывернутые) конфигурацией	Эритроциты	31	[56]
Холинeргические синапсомы	Мозг	85	[57]
Микросомы	Печень		[50]
Аппарат Гольджи	»	9,1	[58]
Лизосомы	»	30	[59]
Окаймленные везикулы	Мозг		[60, 61]
Синаптические везикулы	»		[62]

¹⁾ Эффективность адсорбции определяется как отношение уровней специфического и неспецифического связывания и относится только к первому из указанных типов клеток и к первой ссылке. Она зависит от используемого носителя. Дополнительные ссылки, касающиеся успешного фракционирования субклеточных фракций с помощью иммуноаффинных методов и эффективности адсорбции, приведены в работе [52].

4. Иммунологическая очистка субклеточных фракций

В отличие от методов разделения, основанных на различиях в физических параметрах органелл (гл. 1 и 2), иммунологические методы разделения субклеточных компонентов опираются на различия в их биологических свойствах (например, это может быть различие в экспрессии антигенов). Наиболее часто используются иммуноаффинные методы, которые позволяют проводить очистку быстро и с высоким выходом. Эти методы оказываются особенно ценными в тех случаях, когда в распоряжении исследователя имеются лишь небольшие количества материала (например, культуры клеток). Они имеют и то преимущество, что при этом используются физиологические солевые растворы и органеллы не подвергаются воздействию необычных сред, осмотическому или электрическому шоку. С момента появления первого сообщения об использовании иммуноаффинных методов для фракционирования субклеточных структур [47] и об успешном выделении конкретных клеточных органелл [48—50] прошло довольно много времени, но лишь недавно иммуноаффинные методы стали широко и эффективно использовать для анализа различных биологических систем (табл. 3.5). Критерии создания эффективных методов субклеточного иммуноаффинного фракционирования, сформулированные в обзорах [51, 52], тре-

буют от исследователей внимания как к свойствам используемых антител, так и к природе применяемых твердофазных носителей.

4.1. Антитела, использующиеся при субклеточном фракционировании

Иммуноаффинные методы, использующиеся для субклеточного фракционирования, можно разделить на две категории: методы с применением прямых иммуносорбентов, когда антитела против определенных органелл ковалентно связывают с носителем, и методы, основанные на использовании непрямых иммуносорбентов, когда к твердой фазе ковалентно пришивающий связывающий антитела реагент, и в результате образуется сорбент, способный связывать комплекс антитела — органеллы (рис. 3.2). Однако прямые иммуносорбенты редко бывают эффективны; как и при аффинной хроматографии, это объясняется стерическими препятствиями, возникающими при присоединении к ним крупных частиц. Большая эффективность непрямых сорбентов обусловлена тем, что в этом случае имеется гибкая длинная «ножка», и стерические ограничения уменьшаются. В качестве реагента, который пришивают к твердой фазе, могут использоваться вторые антитела против иммуноглобулинов (поли- или моноклональные) либо белок А из *Staphylococcus aureus*, который связывается с Fc-доменом многих молекул иммуноглобулинов [63]. Иногда роль твердофазной подложки играют фиксированные, инактивированные нагреванием бактерии *S. aureus* [60, 61]. Методы с непрямыми сорбентами позволяют стандартизовать процедуры и использовать одну твердую фазу для приготовления препаратов различных органелл, применяя антитела разной специфичности.

Выбор первых и вторых антител определяется их доступностью, хотя часто учитываются и другие соображения. В принципе первое антитело должно специфически взаимодействовать с соответствующей органеллой или нужным фрагментом мембраны и обладать высокой авидностью. На практике поликлональные антитела к изолированным органеллам редко бывают специфичны из-за наличия загрязнений в препаратах органелл, а также потому, что на мембранах различных органелл находятся одинаковые антигены. Эти препятствия не всегда являются непреодолимыми. Например, при выделении плазматических мембран реакцию с поликлональной антисывороткой можно проводить с клетками до гомогенизации, так что антителами будет помечена только плазматическая мембрана [49]. Если проводить эту процедуру на холоду, то эндоцитоза антител происходить не будет [64], а кинетика связывания антител, для ко-

торой характерна большая скорость ассоциации комплексов и малая скорость их диссоциации, будет препятствовать перераспределению антител.

Поликлональные антитела против органелл обычно получают, используя специфические антигены (белки, липиды или углеводы), или очищают эти антитела с помощью аффинной хроматографии на соответствующих антигенах. Иногда используют одновременно оба приема. При очистке значительно повышается специфичность реагента и удаляются загрязняющие препарат иммуноглобулины, которые мешают при использовании твердофазного связывающего антитела сорбента. Несвязанный иммуноглобулин после реакции с первыми антителами обычно уда-

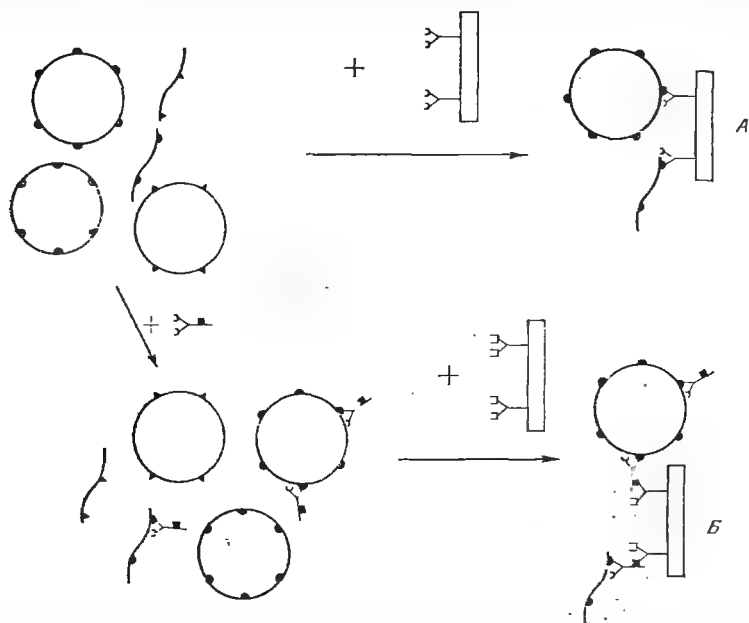


Рис. 3.2. Прямой (А) и непрямой (Б) иммуноаффинный метод выделения клеточных органелл и мембран. В первом случае проводят реакцию между гомогенатом или частично очищенными субклеточными фракциями и антителами против органелл, иммобилизованных на твердом носителе. Во втором случае проводят реакцию между свободными антителами против органелл и гомогенатом (или соответствующей фракцией), не связавшиеся антитела отмывают и выделяют органеллы с помощью иммуносорбента, связывающего антитела. На рис. Б этот иммуносорбент показан в виде иммобилизованных на твердой фазе антител к иммуноглобулинам, способных реагировать с антигенным сайтом (черный квадратик), расположенным в F_c -области антител против органеллы. Как видно из рисунка, и в первом и во втором случае будут выделены только такие мембраны и органеллы, в составе которых антиген имеет правильную топографию; структуры, содержащие другие антигены или имеющие вывернутую ориентацию, останутся несвязанными.

ляют отмыванием, но без этой процедуры можно обойтись, если использовать аффинно очищенные антитела в нужном разведении. Применение аффинно очищенных антител против органелл позволяет проводить очистку в один прием, поскольку эти антитела можно заранее связать с анти-иммуноглобулиновым сорбентом перед инкубацией с клеточным гомогенатом или с частично очищенной субклеточной фракцией [58].

Поликлональные антитела против эндогенного компонента данной органеллы можно использовать и в другом варианте, а именно — изменить антигенную структуру выделяемой органеллы. Так, в плазматические мембраны для этой цели включили вирусный белковый антиген [56], а затем выделили их, используя реакцию связывания с антителами к вирусному белку и с иммуносорбентом против иммуноглобулинов класса G. Вирусный белок включается в мембраны при простом понижении pH внешней среды, а затем диффундирует в плоскости фосфолипидного бислоя. Таким образом было показано, что иммуноаффинное выделение мембран зависит от плотности антигенов, которая должна быть больше 50 молекул на 1 мкм^2 . Вероятно, эта закономерность носит общий характер [54, 56], и ее нужно учитывать при выборе антигена для получения антител против данной органеллы. Это позволяет также выделять мембраны и органеллы, обогащенные антигеном, который в других компонентах клетки присутствует в меньших концентрациях.

Вероятно, для субклеточного фракционирования можно использовать и высокоаффинные моноклональные антитела. Каждое моноклональное антитело способно реагировать только с одной антигенной детерминантой, и как это отражается на их применимости для иммуноаффинной хроматографии — неясно. Однако можно использовать не одно антитело, а смесь моноклональных антител разной специфичности. Более серьезная проблема, которая возникает при применении моноклональных антител, связана с методикой скрининга для выбора секретирующих антитела гибридом. Для подтверждения специфичности данного антитела к антигену определенной органеллы может понадобиться использовать иммунофлуоресцентную или даже иммуноэлектронную микроскопию, а это сопряжено с большими затратами времени. Впрочем, достаточно эффективными могут оказаться и более простые тесты на связывание с клеточными органеллами и мембранными фракциями, представленные в табл. 3.3. В будущем антитела с заранее заданной специфичностью для фракционирования субклеточных компонентов можно будет получать, используя синтетические полипептидные эпитопы или применяя методы молекулярного клонирования.

Антитела против иммуноглобулинов, пришиваемые к твердофазному носителю для последующего непрямого иммуноаффин-

ного выделения, должны обладать высокой avidностью, реагировать с иммуноглобулинами разного типа и быть доступными в больших количествах. Для этих целей особенно подходят определенные моноклональные антитела, поскольку при наличии единственной линии гибридом могут быть получены практически неограниченные количества антител. Для некоторых видов первых поликлональных антител (например, бараньих или кроличьих) имеются соответствующие мышинные моноклональные вторые антитела, а если в качестве первых антител применяются мышинные моноклональные антитела, то для связывания с твердофазным носителем можно использовать крысиные моноклональные антитела против IgG мыши. Белок A из *S. aureus* связывается с Fc-фрагментом иммуноглобулинов, что позволяет изготавливать на его основе иммуносорбенты, обеспечивающие разделение в одну стадию и ориентированное расположение иммуноглобулинов; для изготовления сорбентов проводят реакцию с аффинно очищенными поликлональными антителами и последующую стабилизацию химическими сшивающими реагентами [65].

Для любой методики иммуноаффинного выделения клеточных органелл или фрагментов мембран время взаимодействия и кривые «доза — ответ» для первых антител и иммуносорбента должны определяться экспериментально, с тем чтобы найти оптимальные условия выделения с высоким выходом за наиболее короткое время.

4.2. Носители для иммуноаффинного субклеточного фракционирования

Выбор носителя для аффинной очистки субклеточных частиц определяется рядом факторов; наиболее важные из них — высокая емкость, отсутствие пор, наличие подходящих «ножек», низкий уровень неспецифического связывания, легкость отделения несвязавшегося материала и доступность носителя. По ряду причин для выделения субклеточных фракций рекомендуется использовать носители с высокой емкостью. Например, в случае непрямого выделения, несмотря на интенсивное отмывание, в системе всегда будет присутствовать какое-то количество несвязанных первых антител. Эти свободные антитела будут успешно конкурировать со связанными антителами за места связывания на иммуносорбенте. Кроме того, связывание субклеточных частиц с иммуносорбентом будет тем эффективнее, чем больше потенциальных мест связывания на поверхности как сорбента, так и выделяемых частиц.

Емкость любого иммуносорбента определяется в основном числом мест связывания для взаимодействующих с IgG молекул

(обычно вторых антител) и степенью инактивации этих молекул при ковалентном пришивании к носителю. Наиболее часто используются непористые носители (например, сефароза 6MB, полиакриламид, целлюлоза), поскольку они обладают наибольшей емкостью поверхностного связывания. Высокой суммарной емкостью обладают и пористые носители, например сефароза 4B, однако большая часть мест связывания находится в порах и недоступна для относительно крупных клеточных органелл. Самая высокая емкость связывания (определенная по количеству присоединенного IgG), о которой сообщалось в литературе [57], наблюдалась для второго моноклонального антитела, присоединенного к целлюлозе [66—68]. Целлюлозные носители очень удобны при разделении связанных и несвязанных частиц, поскольку при этом можно использовать низкоскоростное центрифугирование. В случае других носителей для разделения используют колоночную хроматографию или магнитные свойства частиц. В последнем варианте, применяемом в системах со свободным потоком, магнитные частицы оказываются суспендированными, и это существенно уменьшает неспецифическое связывание [51].

Иммуноаффинное выделение субклеточных фракций позволяет получать значительно более чистые препараты, чем классические методы. Степень загрязнения можно оценить по связыванию органелл с носителем в отсутствие первичных антител, а также по количеству определенного загрязняющего компонента, выделяемого вместе с нужной частицей. Неспецифическое связывание с носителем определяется как используемым количеством носителя, так и количеством уже связавшегося белка. Существуют разные способы оценки эффективности процесса адсорбции [51], но наиболее информативным параметром является отношение уровней специфического и неспецифического связывания, которое отражает степень очистки ([52]; табл. 3.5). Это отношение уменьшается с увеличением количества носителя, приходящегося на определенное количество частиц в ходе адсорбции. Следовательно, применение иммуносорбентов с высокой емкостью будет повышать эффективность процесса за счет снижения необходимого для очистки количества иммуносорбента.

4.3. Практические вопросы и возможности применения иммуноаффинного выделения клеточных органелл

В целом для выделения субклеточных структур наиболее подходящими представляются методы непрямой иммуноаффинной очистки. Нужно, чтобы первые антитела обладали высокой специфичностью и авидностью и были направлены против анти-

Таблица 3.6. Иммуноаффинное выделение холинергических нервных окончаний (см. также табл. 5.5)

1. Соскребают 1 г коры мозга крыс и готовят 10%-ный гомогенат ткани в 11%-ном растворе сахарозы¹⁾. Для этого ткань помещают в гомогенизатор со слабо притертым тефлоновым пестиком и гомогенизируют 12 ходами при скорости 640 об/мин. Хранят гомогенат при 4°C.
2. Центрифугируют при 1000 g в течение 10 мин, отбирают супернатант и центрифугируют при 18 000 g в течение 20 мин. Доводят объем осадка до 10 мл раствором сахарозы.
3. Разделяют полученный раствор на две порции по 5 мл. Инкубируют одну часть с бараньей сывороткой анти-(Chol-1) (разведения 1:25—1:200), а другую — с неиммунной бараньей сывороткой в том же разведении. Инкубацию проводят при 4°C в течение 40 мин с периодическим встряхиванием. Доводят объем до 30 мл раствором сахарозы.
4. Центрифугируют при 18 000 g в течение 15 мин (центрифуга Sorvall SS-34, 14 000 об/мин).
5. Промывают осадки три раза по 30 мл раствором сахарозы, каждый раз центрифугируя их при той же скорости.
6. Осадки ресуспендируют в 3 мл перколлы²⁾ и (см. гл. 1) центрифугируют при 9000 g в течение 2 мин. Отбирают верхний слой, содержащий нервные окончания, разбавляют буфером KRH/ЭДТА³⁾ и еще раз центрифугируют.
7. Инкубируют аликвоты объемом 200 мкл с 1—2 мг иммуносорбента⁴⁾ в общем объеме 500 мкл, тщательно перемешивая. Инкубируют при 4°C в течение 40 мин, время от времени перемешивая на вортексе.
8. Отделяют связанные и несвязанные нервные окончания. Для этого добавляют 2,5 мл перколлы, перемешивают и центрифугируют при 9000 g в течение 2 мин.
9. Отбрасывают супернатант. Промывают иммуносорбент три раза перколлом (по 2,5 мл) и один раз буфером KRH⁵⁾.

¹⁾ 11%-ный раствор сахарозы: 0,32 M сахара в 1 mM ЭДТА, 5 mM HEPES pH 7,4.

²⁾ Раствор перколлы: 45% перколлы в буфере KRH/ЭДТА (в/в); см. сноску ⁴⁾.

³⁾ Буфер KRH/ЭДТА: KRH (см. сноску ⁴⁾) + 1 mM ЭДТА, pH 7,4, без Ca²⁺ и Mg²⁺.

⁴⁾ Иммуносорбент: целлюлоза со связанными моноклональными антителами мыши против IgG барана (~0,3 мг мышинных IgG на 1 мг целлюлозы).

⁵⁾ Буфер KRH: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,6 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM глюкоза, 10 mM HEPES, pH 7,4.

генов, присутствующих в выделяемых органеллах в большом количестве. Иммуносорбент должен обладать низким уровнем неспецифического связывания и высокой емкостью, что обеспечивается высокой авидностью вторых антител. Инкубация и все процедуры промывания должны проводиться в мягких условиях, чтобы предотвратить разрушение органелл и образование везикул из мембран [51]. В табл. 3.6 описан метод иммуноаффинного выделения холинергических синапсом (нервных окончаний) из мозга крысы [57]. Подбирая подходящие первые антитела и внося необходимые изменения в методику, можно выделять мембраны и органеллы из клеток других тканей и/или других видов животных.

О возможностях применения иммуноаффинных методов для выделения субклеточных компонентов можно судить по данным,

представленным в табл. 3.5. Иммуноаффинные методы применяли для выделения самых разных органелл: от холинергических синапсом, присутствующих в гомогенате мозга крыс [57], до покрытых клатрином везикул [61]. Эти методы позволяют получать необходимые фракции через два часа после добавления антител и разделять нормальные и вывернутые везикулы (рис. 3.2) [56], что может иметь большое значение для последующих функциональных исследований. Обычно для отделения мембранных фракций от иммуносорбента приходится использовать жесткие условия; однако эта процедура часто оказывается не нужной, поскольку в большинстве случаев выделяемые иммуноаффинными методами частицы сохраняют свои биохимические свойства и в связанном с сорбентом состоянии.

5. Иммунологическое выделение мембранных компонентов

5.1. Солюбилизация мембранных белков

Мембранные белки подразделяют на наружные и внутренние (интегральные) в соответствии с теми методами, которые используются для их солюбилизации [69]. Чтобы можно было исследовать и выделить интегральные белки, их необходимо экстрагировать из мембранного липидного бислоя и встроить в детергентные мицеллы.

Исследователи, работающие в области биохимии мембран, располагают широким набором детергентов с разной химической структурой; их свойства рассмотрены в гл. 5. В первых работах по солюбилизации мембранных белков для получения водных растворов амфифильных белков удаляли гидрофобную часть молекулы протеолизом [70] и исследовали растворимый гидрофильный фрагмент, обладающий биологической активностью. Такой подход с расщеплением мембранного белка на домены особенно ценен, когда он используется параллельно с солюбилизацией с помощью детергентов, которая дает возможность получать интактные молекулы. Однако он не может считаться оптимальным, поскольку не все мембранные белки удается расщепить так, чтобы образовывались гидрофобный и гидрофильный домены. Для выделения некоторых трансмембранных белков используются органические растворители, например бутанол, однако при этом остается ряд неясных моментов. Так, при солюбилизации с помощью бутанола щелочной фосфатазы, возможно, происходит активация эндогенной фосфолипазы [71], во всяком случае, экзогенная фосфолипаза С способствует экстракции щелочной фосфатазы в водный раствор.

5.1.1. Свойства детергентов

В зависимости от электрического заряда детергенты можно разделить на неионные, цвиттерионные, а также анионные или катионные, а по общей структурной организации — на детергенты типов А и В [72]. Детергенты типа А (например, октилглюкозид, саркозил, бридж, тритоны серий Х и N, луброл) имеют гидрофильную головку и гибкий гидрофобный хвост. Они образуют мицеллы с мол. массой 20—90 кДа, в которые встраиваются гидрофобные участки мембранных белков. Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) для детергентов типа А, у которых головка формируется из неионных или цвиттерионных групп, весьма мала (<1 мМ). Ниже этих концентраций детергенты существуют в растворе в виде мономеров. Более высокие значения ККМ для ионных детергентов обусловлены, по-видимому, взаимным отталкиванием ионных групп, формирующих головки, поскольку при увеличении ионной силы среды уменьшается ККМ и увеличивается мол. масса мицелл. Детергент типа В (например, соли желчных кислот и конъюгированные соли желчных кислот, CHAPS) образуют мицеллы с низкой мол. массой и для них характерны высокие значения ККМ. Эти детергенты, взаимодействуя с мембранными белками, образуют монослой, покрывающий гидрофобные участки этих молекул [73].

Более подробная информация о свойствах некоторых детергентов приведена в гл. 5.

Чтобы определить, присутствует ли в солюбилизированной молекуле связывающийся с мембраной участок, можно использовать электрофорез со сдвигом заряда [74] (см. Приложение V). Если белок был солюбилизирован благодаря связыванию с мицеллами нейтрального детергента, то при добавлении анионного детергента, который встраивается в мицеллы, будет наблюдаться увеличение электрофоретической подвижности белка [2]. Если такое увеличение отсутствует, то это предполагает, что белок был солюбилизирован не благодаря связыванию с детергентом и поэтому не содержит связывающегося с мембраной домена.

5.1.2. Критерии солюбилизации

Для подбора оптимального детергента для солюбилизации данного белка целесообразно приготовить нужную мембранную фракцию, в которой содержится этот белок, и хранить ее, разделив на несколько порций, при -70°C ; тогда все эксперименты можно будет провести на одном препарате мембран (см. также гл. 5).

1. *Седиментация при высоких g* . Следует определить выход белка из мембран, ресуспендированных до конечной концентрации белка 5 мг/мл, под действием детергента в концентрации 0,2—3% (в/о) при комнатной температуре и при 4 °C. Для этого мембраны инкубируют с детергентом в течение 30 мин, центрифугируют при 100 000 g 60 мин и определяют активность и суммарное содержание белка в супернатанте и в исходном неотцентрифугированном образце. Эти опыты можно проводить в маленьких пластмассовых пробирках, поместив их по несколько штук в наполненные водой пробирки для ультрацентрифуги и центрифугируя их все вместе. Если при добавлении детергента происходит инактивация белков, то при солюбилизации используют стабилизирующие агенты (например, глицерол), восстанавливающие и хелатирующие вещества, ингибиторы протеаз (гл. 1).

2. *Фракционирование по размерам*. Если данный белок не осаждается после центрифугирования при больших g , мы еще не можем говорить, что произошла его полная солюбилизация [75]. Необходимо определить его размер с помощью электрофореза в ПААГ или гель-фильтрации (см. также гл. 6). Преимущества и недостатки использования электрофореза в ПААГ обсуждаются в работе [76], где подробно описаны также несколько буферных систем для электрофореза в диапазоне pH 5,2—10,9. Подходящими средами для первых пробных экспериментов по гель-фильтрации являются сефароза 6В (Pharmacia) или ультрагель AcA22 (LKB), для которых предельное значение мол. массы частиц, выходящих в исключенном объеме, составляет $\sim 10^3$ кДа. Солюбилизованные белки должны выходить во внутреннем объеме колонки. Мол. массу солюбилизованных белков можно оценить, сравнив их R_f со значением этого параметра для стандартных белков при гель-фильтрации и электрофорезе в ПААГ. Однако получаемые при этом значения молекулярных масс мембранных белков будут относительными из-за влияния связывания их с детергентом, различий в форме молекул и в относительном удельном объеме комплексов детергентов с мембранами и с растворимыми белками, используемыми при калибровке. Величина этой систематической ошибки неизвестна. Тем не менее сравнение размеров белков в различных детергентах полезно для определения степени их солюбилизации.

Солюбилизация в детергентах сильно сказывается на гидрофобных взаимодействиях мембранных белков с липидами и другими белками, влияние же детергента на гидрофильные взаимодействия маловероятно. Например, как было показано в одной из работ [77], HLA-антигены, выделенные методом иммуноаффинной хроматографии, были в значительной степени загрязне-

ны цитоплазматическим актином, и это загрязнение удавалось устранить предварительной обработкой мембран буфером с низкой ионной силой, содержащим АТР и дитиотреитол. Если есть основания полагать, что может произойти загрязнение каким-то другим белком, то в самом начале солюбилизации следует использовать буферы с различной ионной силой.

Очистка солюбилизованных с помощью детергентов мембранных белков с использованием моноклональных антител описана в разд. 5.2. При переходе от аналитических исследований к выделению на препаративном уровне может оказаться необходимым повысить концентрацию детергента, поскольку соотношение между детергентом и липидами, детергентом и белком, а также абсолютная концентрация детергента влияют на эффективность солюбилизации. Например, для солюбилизации всей 5'-нуклеотидазы из плазматических мембран при концентрации белка 3 мг/мл было достаточно 0,5% (в/о) детергента сульфобетанна 14, но при более высоких концентрациях белка и липидов для полной солюбилизации в ходе препаративного выделения необходимо, чтобы концентрация детергента составляла 2% (в/о) [78]. Имеются сообщения, что под действием детергентов может разрушаться комплекс антиген — антитело [79—81]. В этих случаях для солюбилизации и иммуноаффинной очистки можно использовать разные детергенты. Смену детергента можно осуществить с помощью гель-фильтрации.

5.2. Очистка мембранных белков на иммуносорбентах

Несмотря на то что использование поликлональных антител для очистки мембранных белков привело к определенным успехам [82], иммуноаффинные методы выделения получили широкое распространение только с появлением моноклональных антител. В большинстве работ очищенные моноклональные антитела связывали с носителем, используя в качестве сорбента активированную с помощью CNBr сефарозу 4В или аффигель, поставляемые фирмами Pharmacia и BioRad соответственно. Обычно с этими носителями удается связать 1—10 мг белка на 1 мл геля. Антитела связывали также с носителем ультрогель АсА34 (полимер агарозы и акриламида) с помощью глутарового альдегида [83]. Альтернативный подход состоит в связывании антител с модифицированной целлюлозой ([68]; табл. 3.2); получающийся сорбент обладает высокой емкостью, но плохо пропускает элюирующий раствор. Поэтому подобные сорбенты на основе целлюлозы используют для очистки в объеме, а не на колонках.

5.2.1. Нанесение антигена на иммуносорбент на основе моноклональных антител

Нанесение антигена на иммуносорбент можно проводить при 4 °С или при комнатной температуре. При комнатной температуре связывание идет быстрее, но эти условия непригодны, если антиген нестабилен или подвержен протеолизу. Антиген можно наносить на колонки с сефарозой при скорости потока до 20 объемов колонки в час. Проходящий через колонку материал следует тестировать на антигенную активность, и если окажется, что количество несвязавшегося антигена значительно, то необходимо проверить емкость колонки или скорость потока; впрочем, постоянное присутствие некоторого количества несвязанного антигена может быть обусловлено гетерогенностью этого антигена. Инкубацию антигена с целлюлозным иммуносорбентом следует проводить при постоянном перемешивании в течение 30—60 мин при 20 °С или в течение 4 ч при 4 °С. Аликвоту смеси следует отцентрифугировать (2 мин при 9000 *g* в настольной центрифуге фирмы «Эппендорф» или аналогичной), отобрать супернатант и измерить степень связывания антигена иммуносорбентом.

В обоих случаях при использовании колонки и при взаимодействии в объеме необходимо тщательно промывать иммуносорбент после реакции с антигеном. Можно предварительно промыть сорбент элюирующим буфером перед уравниванием в буфере для нанесения, а также провести после реакции с антигеном по меньшей мере одно промывание солевым концентрированным раствором, не вымывающим антиген с поверхности сорбента.

5.2.2. Элюция антигена с иммуносорбента

Для разрушения связи антиген — антитело используют буферные растворы с высоким или низким значением рН, хаотропные ионы/концентрированные солевые растворы и конкурирующие лиганды.

Многие мембранные белки при очистке элюируют при щелочных рН. Для этих целей широко используют диэтиламин (50 мМ, рН 11,2—11,5) (табл. 3.7). Важно быстро нейтрализовать элюированный фермент. Для этого, например, фракции объемом 1 мл с колонки можно собирать в пробирки, содержащие по 0,1 мл 2М трис-НСl, рН 6,8. Если используется целлюлоза, можно фильтровать элюат через стерилизующий фильтр для очистки от микрочастиц. Элюат можно пропускать через маленькую колонку для гель-фильтрации. Буферы с кислым рН используются реже, и в качестве альтернативы растворам с ще-

Таблица 3.7. Условия элюции белков с иммуносорбента на основе моноклональных антител

Условия элюции	Выделяемые белки
А. Высокие pH 50 мМ диэтиламин, pH 11,2—11,5 ±Детергент, 0,1—0,5% +0,14 М NaCl 100 мМ диэтиламин, pH 11,5 ±Детергент, 0,2—0,5% 0,6 М 2-амино-2-метил-1-пропанол, pH 10,2 0,2 М глицин/ОН, pH 10 0,5 М NaCl, 1%-ный холат натрия 20 мМ лизин/ОН, pH 11 0,1%-ный тритон X-100 100 мМ триэтиламин, pH 10 100 мМ триэтиламин, pH 11,5 (0,5%-ный дезоксихолат натрия)	Гликопротеин Thy-1 из мозга крыс [88] Эпоксидгидролаза [89] Рецептор Т-клеточного антигена [90] Антигены HLA-A2, HLA-B7 [77] Антиген W3/13 тимоцитов крысы [91] Антиген ОХ2 крысы [92] Общий антиген, ассоциированный с острым лимфоблейкозом Рецептор трансферрина [65] Мембранный антиген вируса Эпштейна—Барр [93] 5'-Нуклеотидаза из печени крысы [78] Щелочная фосфатаза из печени человека [23] С3b-Инактиватор человека [94] Поверхностный гликопротеин клеток грызунов [95] Мембранный белок <i>Toxoplasma gondii</i> [96] Щелочная фосфатаза из хряща быка [97] Ацетилхолиновый рецептор <i>Torpedo</i> [98] Рецептор фактора роста эпидермиса [84] Кальмодулинсвязывающий белок грызунов [99] Fc-рецептор грызунов [100]
Б. Низкие pH 0,05—0,1 М глицин-HCl, pH 2,5—2,8 Детергент, 0,1—0,2% +0,5 М NaCl 0,2 М уксусная кислота, pH 2,5—3 0,15—0,3 М NaCl, детергент (0,1%) PBS, pH 3,2 5%-ный глицерол 0,1%-ный эмульген 911 0,2 М ацетат аммония, pH 3	Ацетилхолинэстеразы из электрического органа [101] Рецептор фактора роста эпидермиса (денатурированный) [84] Ренин подчелюстных желез мыши [103] Урокиназа [104] Лейкоцитарный интерферон [105] Цитохром P-450 [106] Соматомедин-С/инсулиноподобный фактор роста I [107]

Условия элюции	Выделяемые белки
<i>В. Хаотропные ионы/высокая ионная сила</i> 9 М этандиол, 0,3 М NaCl 0,1 М лимонная кислота, pH 2 1 М NaCl, pH 7,4, детергент (0,1%) 2 М NaCl 3 М NaCl 2 М MgCl₂, pH 7,4 3 М MgCl₂, pH 6,8 4—8 М мочевины в PBS 6 М мочевины 6 М гуанидинхлорид, детер- гент (0,5%) 50 mM ацетат натрия, 1 М KCl, pH 5,5	Лейкоцитарный интерферон [108] Антиген H-2K^k [109] Никотиновые рецепторы аце- тилхолина из мышц крысы [110] Щелочная фосфатаза из пече- ни [111] C9-компонент комплемента че- ловека [112] Тубулин-тирозин—лигаза [113] Специфичный для беременности β1-гликопротеин [114] Рецептор фактора роста эпи- дермиса (денатурированный) [85] Рецептор интерлейкина 2 [115] ДНК-полимераза α [116]

лочным pH обычно применяют буферы с высокой ионной силой и хаотропные ионы. Иногда для получения антигена для таких целей, как анализ аминокислотной последовательности, приходится использовать жесткие условия элюции антигена, если при более мягких условиях его выход невелик [84]. В отдельных случаях удается подобрать условия элюции специально для данных антител. При выделении рецепторов для элюирования можно использовать лиганд, с которым конкурируют моноклональные антитела [85, 86]. Например, при выделении Ca²⁺-кальмодулинзависимой фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов было выбрано моноклональное антитело, специфически связывающееся с комплексом кальмодулина с фосфодиэстеразой и не связывающееся с каждым из компонентов комплекса по отдельности. Связывание происходило в присутствии Ca²⁺, и фермент элюировали, добавляя 2 mM ЭГТА, который хелатировал Ca²⁺ [83].

Изучение свойств имеющихся моноклональных антител может быть весьма полезным и плодотворным. Так, рецептор фактора роста эпидермиса из клеток A431 содержит углеводную структуру антигена группы крови A; было показано, что моноклональные антитела, полученные к этому рецептору, реагируют

с указанным антигеном. Для элюции активного рецептора можно использовать N-ацетилгалактозамин в концентрации 0,25M, который конкурирует за связывание с антителами [87].

5.2.3. Выбор антител и условий элюции

Если для иммунной очистки можно использовать несколько разных антител, то лучше выбрать антитела с низкой аффинностью. Для проведения предварительных экспериментов по изучению различных условий элюции можно использовать целлюлозный иммуносорбент с пришитыми к нему бараньими антителами к IgG мыши (50 мкл с содержанием антител 5 мг/мл), с которым связывают моноклональные антитела из культуральной или асцитной жидкости в разведении 10^{-3} (100 мкл) и антиген. Если определение биологической активности затруднено, можно воспользоваться радиоактивно меченным антигеном и следить за появлением метки в элюате. Условия, при которых удастся получить хорошие результаты, применяют затем для элюции биологически активного антигена. После элюции рекомендуется провести гель-фильтрацию, чтобы освободиться от агрегированного или денатурированного антигена или следовых количеств несвязанных моноклональных антител.

6. Использование антител для отбора комплементарных ДНК, кодирующих мембранные белки

Чтобы до конца понять структурные свойства белка, необходимо знать его первичную структуру. Однако минорные мембранные белки очень трудно получить в чистом виде в количестве, достаточном для определения их аминокислотной последовательности обычными методами белковой химии. Альтернативный подход к решению этой проблемы может состоять в секвенировании комплементарной ДНК (кДНК), кодирующей нужный белок. А для этого в свою очередь необходимы зонды, позволяющие провести детекцию специфической ДНК. Если известна первичная структура коротких фрагментов белка, то можно синтезировать олигонуклеотидные зонды для скрининга кДНК, а критерии пригодности для таких зондов хорошо известны [117]. Когда нет никакой информации о первичной структуре, создание таких зондов становится невозможным, а поскольку для большинства минорных мембранных белков не удастся получить в большом количестве соответствующую мРНК, не может быть проведен и скрининг клонов кДНК методом гибридно-селективной трансляции [118]. Весьма элегантный подход к решению проблем, связанных со скринингом, основан на использовании специфических антител для идентификации клонов кДНК.

6.1. Фаговые векторы

Для получения антител, которые можно было бы использовать в качестве зондов, было сконструировано несколько фаговых и плазмидных векторов [119—124]. Чаще всего применяется фаговый вектор λ gt11 [123—125], в котором соответствующая кДНК встроена вблизи 3'-конца структурного гена, кодирующего β -галактозидазу. В результате рекомбинантные бактерии продуцируют слитные белки, состоящие из большого фрагмента молекулы β -галактозидазы и С-концевого сегмента пептида, кодируемого кДНК. Синтез слитного белка можно индуцировать химически. Белки, высвобождающиеся после лизиса клеток в составе бляшек, иммобилизуют на нитроцеллюлозном фильтре, а затем проводят реакцию со специфическими антителами аналогично тому, как это делается при иммуноблоттинге (разд. 3). Имеется великолепное описание экспериментальных методов создания и скрининга библиотек кДНК в λ gt11 [125]. Ценность вектора λ gt11 при клонировании и секвенировании кДНК, кодирующих минорные мембранные белки, иллюстрирует использование его для определения структуры белка — переносчика глюкозы у человека [126].

6.2. Плазмидные векторы

Для клонирования с успехом используется и плазмидный строго регулируемый вектор рЕХ [124] (рис. 3.3). В этом случае кДНК также встраивается вблизи 3'-конца гена, кодирующего β -галактозидазу; последний в свою очередь располагается вслед за мощным промотором. У вектора рЕХ имеются три разные модификации, что позволяет встраивать чужеродную ДНК в правильную рамку считывания. Встраивание осуществляется в линейную последовательность, содержащую нужный сайт рестрикции. Регуляция синтеза слитных белков достигается благодаря введению плазмид в штамм *Escherichia coli*, продуцирующий температурочувствительный репрессор; слитные белки синтезируются только при повышении температуры до 42°C. Для амплификации плазмиды перед повышением температуры клетки инкубируют при 30°C.

Какой бы вектор ни использовался, необходимо иметь возможность регулировать синтез слитного белка (химическая индукция для λ gt11 или температурная индукция для рЕХ) в тех случаях, когда он токсичен для клеток. Плаزمида рЕХ применялась для скрининга библиотек кДНК реже, чем фag λ gt11. Однако простота работы с плазмидной ДНК и возможность получения слитных белков в количестве, составляющем 25% от суммарного содержания клеточного белка, создают предпосылки

для преимущественного использования именно плазмидного вектора. Эти преимущества особенно ощутимы, когда необходим вектор для экспрессии и клонирования определенного фрагмента кДНК, позволяющего получить белок, который можно использовать как иммуноген для приготовления антител необходимой специфичности.

6.3. Скрининг

Процедура блоттинга колоний [127] с применением антител для скрининга библиотек кДНК в рЕХ описана в табл. 3.8. Она сходна с процедурой иммуноблоттинга (табл. 3.4). Вообще говоря, в качестве зонда при скрининге по экспрессии можно ис-

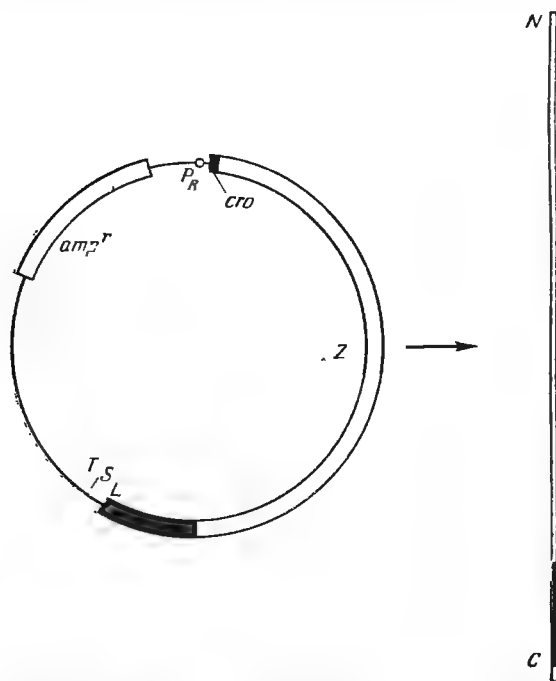


Рис. 3.3. Вектор на основе плазмиды рЕХ. Такие векторы кодируют белки, слитые с β -галактозидазой, — нерастворимые и образующие плотные тельца-включения в клетках; они составляют до 25% суммарного белка *E. coli*. Подобные плазмиды содержат ген β -лактамазы, apr^r ; мощный промотор P_R ; гибридные гены $sgo-lac I-lac Z$ (Z); олигонуклеотидный линкер, содержащий сайты клонирования (L), который в данном случае содержит короткую кДНК с открытой рамкой считывания (зачерненный участок); олигонуклеотид, содержащий стоп-кодоны для трансляции во всех рамках считывания (S) и фрагменты терминации (T) из фага fd. Изображен также полипептид, кодируемый гибридным геном и вставкой кДНК.

Таблица 3.8. Процедура блоттинга колоний для скрининга библиотек кДНК в рЕХ

А. Выращивание и экспрессия

1. Заливают квадратные пластины размером 24×24 см 200 мл L-бульона, содержащего 100 мкг/мл ампициллина и 1,6% (в/о) агара. Высушивают пластины, выдерживая их в течение ночи без крышек в перевернутом положении.
2. Культуру клеток клонотекки разбавляют до концентрации 10^4 клеток/мл в L-бульоне, инкубируют 15 мин при 34°C , а затем разбрызгивают по 1,5 мл по поверхности пластины. Инкубируют в течение 20 ч при 30°C .
3. Снимают крышку с пластины на 15 мин. Осторожно накладывают на пластину сухой нитроцеллюлозный фильтр (Schleicher and Schull, 0,45 мкм). Аккуратно прокатывают его и помечают положение, проколов отверстия иглой. Снимают фильтр с прикрепившимися колониями ($1-5 \cdot 10^4$) и кладут колониями вверх) на два листа бумаги ватман 3ММ, смоченные L-бульоном с ампициллином. Бумагу прокатывают, чтобы удалить пузыри воздуха. Инкубируют 2 ч при 42°C .

Б. Лизис и электрофорез

1. Фильтр помещают (колониями вверх) на два листа бумаги ватман 3ММ, предварительно смоченные в 5%-ном ДСН и прокатанные. Прогревают в закрытом контейнере, поместив его в обычный термостат (95°C , 15 мин) или в микроволновую печь (45 с, 600 Вт, затем 60 с, 200 Вт), до тех пор, пока колонии не станут полупрозрачными.
2. Укладывают фильтр в сэндвич для блоттинга (как это описано в табл. 3.4 для иммуноблоттинга белков, без акриламидного геля) таким образом, чтобы колонии располагались со стороны катода, и проводят электрофорез в течение 30 мин при 50 В. Это обеспечивает прочное прикрепление белков, содержащихся в колониях, к нитроцеллюлозе и удаление избытка ДСН. Электрофорез можно проводить в специальных емкостях, позволяющих использовать большие фильтры; можно также разрезать фильтры так, чтобы они входили в обычные аппараты для блоттинга.

В. Инкубация с антителами, проявление и окрашивание

Фильтры инкубируют, используя PBS, pH 7,4, содержащий 0,5% (в/о) желатин [или 10% (в/в) лошадиной сыворотки] и 0,1% (в/в) тритона X-100, если это не оговорено особо, по следующей схеме.

1. Промывают фильтры 5 мин в буфере.
2. Промывают фильтры 20 мин в буфере с добавлением ДНКазы до конечной концентрации 10 мкг/мл.
3. Промывают фильтры дважды по 5 мин.
4. Помещают фильтр между сухими листами бумаги ватман 3ММ и прокатывают круглой палочкой для удаления обломков бактериальных клеток.
5. Инкубируют 60 мин с первыми антителами. Обычно используют IgG в концентрации 1 мкг/мл в буфере, содержащем белок *E. coli*, который добавляют для предотвращения неспецифического связывания с колониями.
6. Промывают фильтры три раза по 5 мин.
7. Инкубируют фильтры 60 мин со вторыми антителами, меченными пероксидазой хрена (антитела, производимые фирмой TAGO Inc., Barlinghame, USA, в разведении 1 : 2000).
8. Промывают фильтры три раза по 5 мин.
9. Промывают фильтры PBS два раза по 5 мин.
10. Проявляют фильтры в 0,1 М трис-HCl, pH 7,4, содержащем 0,5 мг/мл 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорида и 1 : 5000 H_2O_2 .

11. Помечают позитивные колонии, а затем окрашивают фильтр красителем понсо S. Позитивные колонии берут с исходной пластины. Объем жидкости, используемой для промывания, составляет 20—30 мл на квадратный фильтр размером 24×24 см.

пользовать антитела, позволяющие выявлять 10 нг белка при стандартной процедуре иммуоблоттинга.

Вопрос о том, какие антитела — поликлональные или моноклональные — лучше применять для первичного скрининга, пока не решен. Весьма привлекательным представляется использование аффинно очищенных поликлональных антител, поскольку при этом выявляется любой из нескольких эпитопов исходного белка. Однако при скрининге по экспрессии будет увеличиваться вероятность получения ложнопозитивных результатов из-за присутствия поликлональных антител против любых загрязнений в иммуногене, поскольку загрязняющий компонент может продуцироваться в такой же концентрации, что и нужный антиген. В качестве компромиссного варианта можно рекомендовать отбор клонов с помощью аффинно очищенных поликлональных антител и моноклональных антител [36, 124]; с успехом использовались и смеси нескольких моноклональных антител [128]. О получении позитивных клонов можно говорить более или менее уверенно, если выделены соответствующие колонии и проведен вторичный скрининг, а также иммуоблоттинг слитного белка, аффинная очистка антител на слитном белке с последующим блоттингом на препарате исходного антигена и проверены реакции с несколькими антителами. Однако для полной уверенности необходимо провести секвенирование и сравнить полученные данные с тем, что известно о первичной структуре белка. Это могут быть данные об аминокислотном составе белка, первичной структуре его фрагментов и/или о каких-то сайтах протеолитического расщепления.

6.4. Перспективы

Несмотря на то что при использовании антител в качестве зондов для клонирования по экспрессии могут получаться ложнопозитивные результаты [129], этот метод находил все более широкое применение. Векторы для экспрессии рекомбинантных продуктов могут оказаться особенно ценными при исследовании топографии мембранных белков. Так, можно создать систему для синтеза *in vitro* определенных участков белковых молекул и использовать их для получения антител заданной специфичности. С помощью этих антител можно попытаться установить топографию белка в составе мембраны. Кроме того, появится возможность получать антитела к определенным доменам мембранных

белков для таких целей, как модификация функции белка или применение их в качестве первых антител при иммуноаффинном выделении определенных органелл. Такие антитела с заранее заданной специфичностью без сомнения окажутся очень ценными для последующих исследований структуры и функций клеточных мембран.

7. Благодарности

Мы благодарны профессору С. N. Hales, д-ру К. Siddle, д-ру К. K. Stanley и д-ру К. Howell за многочисленные полезные и плодотворные дискуссии. Экспериментальные работы авторов, упоминающиеся в этой статье, субсидировали следующие организации: Medical Research Council, the Arthritis and Rheumatism Council, the British Diabetic Association, the Beit Foundation, the European Molecular Biology Organisation, St. John's College, Cambridge, IQ Bio Ltd, Cambridge, Muscular Dystrophy Group of Great Britain and Northern Ireland.

Литература

1. Siddle K., Soos M. (1981). In: Monoclonal Antibodies and Developments in Immunoassay. Albertini A., Ekins R. (eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, New York and Oxford, p. 53.
2. Bailyes E. M., Soos M., Jackson P., Newby A. C., Siddle K., Luzio J. P. (1984). *Biochem. J.*, **221**, 369.
3. Atassi M. Z. (1985). *Eur. J. Biochem.*, **145**, 1.
4. Lerner R. A. (1984). *Adv. Immunol.*, **36**, 1.
5. Berzofsky J. A. (1985). *Science*, **229**, 932.
6. Berek C., Griffiths G. M., Milstein C. (1985). *Nature*, **316**, 412.
7. Herbert W. J. (1978). In: Handbook of Experimental Immunology. 3rd edition, Weir D. M. (ed.), Blackwell, Oxford, London, Edinburgh and Melbourne, Vol. 3, Appendix 4.
8. Herbert W. J. (1978). In: Handbook of Experimental Immunology. 3rd edition, Weir D. M. (ed.), Blackwell, Oxford, London, Edinburgh and Melbourne, Vol. 3, Appendix 3.
9. Repasky E. A., Granger B. L., Lazarides E. (1982). *Cell*, **29**, 821.
10. Knudsen K. A. (1985). *Anal. Biochem.*, **147**, 285.
11. Rapport M. M., Graf L., Yariv J. (1961). *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 438.
12. Jones R. T., Walker J. H., Richardson P. J., Fox G. Q., Whittaker V. P. (1981). *Cell Tissue Res.*, **218**, 355.
13. Eisenbarth G. S., Walsh F. S., Nirenberg M. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4913.
14. Geiger B., Smolarsky M. (1977). *J. Immunol. Methods*, **17**, 7.
15. Young W. W., Hakamori S.-I., Durdik J. M., Henney C. S. (1980). *J. Immunol.*, **124**, 199.
16. Weir D. M., ed. (1978). Handbook of Experimental Immunology. Blackwell, Oxford, London, Edinburgh and Melbourne, Vols. 1—3.
17. Goding J. W. (1978). *J. Immunol. Methods*, **20**, 241.
18. Kohler G., Milstein C. (1975). *Nature*, **256**, 495.
19. Galfre G., Milstein C. (1981). *Methods Enzymol.*, **73**, 3.
20. Goding J. W. (1983). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, Inc.

21. *Morgan D. O., Roth R. A.* (1985). *Endocrinology*, **116**, 1224.
22. *Jemmerson R., Fishman W. H.* (1982). *Anal. Biochem.*, **124**, 286.
23. *Bailes E. M., Siddle K., Luzio J. P.* (1985). *Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 107.
24. *Slaughter C. A., Coseo M. C., Abrams C., Cancro M. P., Harris H.* (1980). In: *Monoclonal Antibodies, Hybridomas*. Kennett R. H., McKearn T. J., Bechtol K. B. (eds.), Plenum Press, New York, London, p. 111.
25. *Kennett R. H., McKearn T. J.* (1980). In: *Monoclonal Antibodies, Hybridomas*. Kennett R. H., McKearn T. J., Bechtol K. B. (eds.), Plenum Press, New York, London, p. 391.
26. *Renart J., Reiser J., Stark G. R.* (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3116.
27. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350.
28. *Norrild B., Bjerrum O. J., Vestergaard P. F.* (1977). *Anal. Biochem.*, **81**, 432.
29. *Burnette W. N.* (1981). *Anal. Biochem.*, **112**, 195.
30. *Gershoni J. M., Palade G. E.* (1983). *Anal. Biochem.*, **131**, 1.
31. *Towbin H., Gordon J.* (1984). *J. Immunol. Methods*, **72**, 313.
32. *Gershoni J. M.* (1985). *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 103.
33. *Bjerrum O. J., Heegaard N. H. N.* (1987). *Handbook of Immunoblotting* CRC Press, Boca Raton, Florida, in press.
34. *Jackson P., Thompson R. J.* (1984). *Electrophoresis*, **5**, 32.
35. *Olmsted J. B.* (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 11955.
36. *Stanley K. K., Kocher H.-P., Luzio J. P., Jackson P., Tschopp J.* (1985). *EMBO J.*, **4**, 375.
37. *Panyim S., Chalkley R.* (1969). *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337.
38. *Bradbury J. M., Thompson R. J.* (1984). *Biochem. J.*, **221**, 361.
39. *Oblas B., Boyd N. D., Singer R. H.* (1983). *Anal. Biochem.*, **130**, 1.
40. *Holmberg D., Ivars F., Edlund T.* (1983). *J. Immunol. Methods*, **61**, 9.
41. *Maruyama K., Mikawa T., Ebashi S.* (1984). *J. Biochem. (Tokyo)*, **95**, 511.
42. *Jackson P. J., Luzio J. P.* (1987). In: *Handbook of Immunoblotting*, Bjerrum O. J., Heegaard N. H. N. (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, in press.
43. *Stanley K. K., Page M., Campbell A. K., Luzio J. P.* (1986). *Mol. Immunol.*, **23**, 451.
44. *Towbin H., Schoenenberger C., Ball R., Braun D. G., Rosenfelder G.* (1984). *J. Immunol. Methods*, **72**, 471.
45. *Magnani J. L., Nilsson B., Brockhaus M., Zopf D., Steplewski H., Koprowski H., Ginsburg V.* (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 14365.
46. *Harpin M. L., Coulon-Morelec M. J., Yeni P., Danon F., Baumann N.* (1985). *J. Immunol. Methods*, **78**, 135.
47. *Hales C. N.* (1972). *Diabetologia*, **8**, 229.
48. *Luzio J. P., Newby A. C., Hales C. N.* (1974). *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 1385.
49. *Luzio J. P., Newby A. C., Hales C. N.* (1976). *Biochem. J.*, **154**, 11.
50. *Kawajiri K., Ito A., Omura T.* (1977). *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**, 779.
51. *Howell K. E., Ansorge W., Gruenberg J.* (1986). In: *Microspheres: Medical and Biological Applications*. Rembawn A., Tokes Z. (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, in press.
52. *Richardson P. J., Luzio J. P.* (1986). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, in press.
53. *Westwood S. A., Luzio J. P., Flockhart D. A., Siddle K.* (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **583**, 454.
54. *Devaney E., Howell K. E.* (1985). *EMBO J.*, **4**, 3123.
55. *Roman L. M., Hubbard A. L.* (1984). *J. Cell Biol.*, **98**, 1497.
56. *Gruenberg J., Howell K. E.* (1985). *Eur. J. Cell Biol.*, **38**, 312.
57. *Richardson P. J., Siddle K., Luzio J. P.* (1984). *Biochem. J.*, **219**, 647.

58. Ito A., Palade G. E. (1978). *J. Cell Biol.*, **79**, 590.
59. Pontremoli S., Melloni E., Diamani G., Michetti M., Salamino F., Sparatone B., Horecker B. L. (1984). *Arch. Biochem. Biophys.*, **233**, 267.
60. Merisko E. M., Farquhar M. G., Palade G. E. (1982). *J. Cell Biol.*, **92**, 846.
61. Pfeffer S. R., Kelly R. B. (1985). *Cell*, **40**, 949.
62. Matthew W. D., Tsavaler L., Reichardt L. F. (1981). *J. Cell Biol.*, **91**, 257.
63. Kronvall G., Seal V. S., Finstad J., Williams R. C. (1970). *J. Immunol.*, **104**, 140.
64. Luzio J. P., Stanley K. K. (1983). *Biochem. J.*, **216**, 27.
65. Schneider C., Newman R. A., Sutherland D. R., Asser V., Greaves M. F. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 10766.
66. Gurvich A. E., Kapner R. B., Nezlin R. S. (1959). *Biokhimiya*, **24**, 129.
67. Gurvich A. E., Kuzovleva O. B., Turmanova A. E. (1961). *Biokhimiya*, **26**, 803.
68. Hales C. N., Woodhead J. S. (1980). *Methods Enzymol.*, **70**, 334.
69. Singer S. J. (1974). *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 805.
70. Cresswell P., Turner M. J., Strominger J. L. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1603.
71. Miki A., Kominani T., Ikehara Y. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 89.
72. Helenius A., Simons K. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 29.
73. Newby A. C. (1984). *Brain Receptor Methodologies*, Part A. Marangos P. J., Campbell I. C., Cohen R. M. (eds.), Academic Press, NY, p. 75.
74. Helenius A., Simons K. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6368.
75. Kagawa Y. (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 297.
76. Newby A. C., Chrambach A., Bailyes E. M. (1982). *Tech. Life Sci. Biochem.* **B4**, 1.
77. Pober J. S., Guild B. C., Strominger J. L., Veatch W. R. (1981). *Biochemistry*, **20**, 5625.
78. Bailyes E. M., Newby A. C., Siddle K., Luzio J. P. (1982). *Biochem. J.*, **203**, 245.
79. Crumpton M. J., Parkhouse R. M. E. (1972). *FEBS Lett.*, **22**, 210.
80. Herrman S. H., Mescher M. F. (1979). *J. Biol. Chem.*, **254**, 8713.
81. Driessen M., Weitz G., Brouwer-Kelder E. M., Donker-Koopman W. E., Bastiaannet J., Sandhoff K., Barranger J. A., Tager J. M., Schram A. W. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **841**, 97.
82. von Weicker H., Kropp J., Roecke D. (1971). *Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.*, **5**, 375.
83. Hansen R. S., Beavo J. A. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2788.
84. Yarden Y., Harari I., Schlessinger J. (1985). *J. Biol. Chem.*, **260**, 315.
85. Weber W., Bertics P. J., Gill G. N. (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 14631.
86. Fraser C. M., Venter J. C. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 21.
87. Parker P. J., Young S., Gullick W. J., Mayes E. L., Bennett P., Waterfield M. D. (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 9906.
88. Campbell D. G., Gagnon J., Reid K. B. M., Williams A. F. (1981). *Biochem. J.*, **195**, 15.
89. Kennedy S. M., Burchell B. (1983). *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2029.
90. Acuto O., Fabbi M., Smart J., Poole C. B., Protentis J., Royer H. D., Schlosman S. F., Reinherz E. L. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3851.
91. Brown W. R. A., Barclay A. N., Sunderland C. A., Williams A. F. (1981). *Nature*, **289**, 456.
92. Barclay A. N., Ward H. A. (1982). *Eur. J. Biochem.*, **129**, 447.
93. Randle B. J., Morgan A. J., Stripp S. A., Epstein M. A. (1985). *J. Immunol. Methods*, **77**, 25.
94. Hsu L., Barclay A. N., Brandon M. R., Sim E., Porter R. R. (1982). *Biochem. J.*, **203**, 293.

95. Hughes E. N., August J. T. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 3970.
96. Kasper L. H., Crabb J. H., Pfefferkorn E. R. (1983). *J. Immunol.*, **130**, 2407.
97. Hsu H. H., Munoz P. A., Barr J., Oppliger I., Morris D. C., Vaananen H. K., Tarkenton N., Anderson H. C. (1985). *J. Biol. Chem.*, **260**, 1826.
98. Lennon V. A., Thompson M., Chen J. (1980). *J. Biol. Chem.*, **255**, 4395.
99. Orlow S. J., Rosenstreich D. L., Pifco-Hirst S., Rosen O. M. (1985). *J. Immunol.*, **134**, 449.
100. Mellman I. S., Unkeless J. C. (1980). *J. Exp. Med.*, **152**, 1048.
101. Sakai M., Saisu H., Koshigoe N., Abe T. (1985). *Eur. J. Biochem.*, **148**, 197.
102. Nielsen L. S., Hansen J. G., Andreasen P. A., Skriver L., Dan K., Zeuthen J. (1983). *EMBO J.*, **2**, 115.
103. Inagaki T., Ohtsuki K., Inagami T. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 7476.
104. Herion P., Bollen A. (1983). *BioSci. Rep.*, **3**, 373.
105. Staehelin T., Hobbs D. S., Kung H., Pestka S. (1981). *Methods Enzymol.*, **78**, 505.
106. Cheng K. C., Gelboin H. V., Song B. J., Park S. S., Friedman F. K. (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 12279.
107. Chernauek S. D., Chatelain P. G., Svoboda M. E., Underwood L. E., VanWyk J. J. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 282.
108. Secher D. S., Burke D. C. (1980). *Nature*, **285**, 446.
109. Mole J. E., Hunter F., Paslay J. W., Bhowan A. S., Bennett J. C. (1982). *Mol. Immunol.*, **19**, 1.
110. Momoi M. Y., Lennon V. A. (1984). *J. Neurochem.*, **42**, 59.
111. Meyer L. J., Lafferty M. A., Raducha M. G., Foster C. J., Gogolin K. J., Harris H. (1982). *Clin. Chim. Acta*, **125**, 109.
112. Morgan B. P., Daw R. A., Siddle K., Luzio J. P., Campbell A. K. (1983). *J. Immunol. Methods*, **64**, 269.
113. Schroder H. C., Wehland J., Weber K. (1985). *J. Cell Biol.*, **100**, 276.
114. Heikinheimo M., Stenman V. H., Bang B., Hurme M., Makela O., Bohn H. (1983). *J. Immunol. Methods*, **60**, 25.
115. Urdal D. L., March C. J., Gillis S., Larsen A., Dower S. K. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6481.
116. Wang T. S., Hu S. Z., Korn D. (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 1854.
117. Lathe R. (1985). *J. Mol. Biol.*, **183**, 1.
118. Harpold M. M., Dobner P. R., Evans R. M., Bancroft F. C. (1978). *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2039.
119. Gray M. R., Colot H. V., Guarente L., Rosbash M. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6598.
120. Helfman D. M., Feramisco J. R., Fiddes J. C., Thomas G. P., Hughes S. H. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 31.
121. Ruther U., Muller-Hill B. (1983). *EMBO J.*, **2**, 1791.
122. Weinstock G. M., ap Rhys C., Berman M. L., Hampar B., Jackson D., Silhavy T. J., Weisemann J., Zweig M. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4432.
123. Young R. A., Davis R. W. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1194.
124. Stanley K. K., Luzio J. P. (1984). *EMBO J.*, **3**, 1429.
125. Huynh T. V., Young R. A., Davis R. W. (1985). In: *DNA Cloning I—A Practical Approach*. Glover D. (ed), IRL Press, Oxford and Washington, DC, Vol. 1, p. 47.
126. Mueckler M., Caruso C., Baldwin S. A., Panico M., Blench I., Morris H. R., Allard W. J., Lienhard G. E., Lodish H. F. (1985). *Science*, **229**, 941.
127. Stanley K. K. (1983). *Nucleic Acid Res.*, **11**, 4077.
128. Jenne D., Stanley K. K. (1985). *EMBO J.*, **4**, 3153.
129. Siddle K., Pauza D., Bellatin J., Lennox E. S., Stanley K. K. (1986). *Biochem. Soc. Trans.*, **14**, 318.

РАЗДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ МЕМБРАН

Джоан А. Хиггинс

1. Введение

Липиды являются основными компонентами мембран, составляя от 20 до 80% их массы. Согласно современным представлениям, липиды организованы в мембране преимущественно в виде бислоя. Белки могут быть включены в бислой или связаны с его поверхностью. Одна из главных функций мембран состоит в формировании замкнутых барьеров типа плазматической мембраны или мембран внутриклеточных органелл. Свойства этих барьеров определяются прежде всего физическими характеристиками липидов. Однако липиды не только формируют инертный мембранный матрикс. Недавние исследования показали, что они играют более важную роль. Имеются указания, что реакция клеток на некоторые внешние стимулы, например действие гормонов, нейромедиаторов и ростовых факторов, осуществляется с участием мембранных липидов. Гидролиз полифосфоинозитидов приводит к образованию двух вторичных посредников — инозитолтрифосфата и диацилглицерола. Функция первого состоит в увеличении внутриклеточной концентрации кальция, а второй активирует протеинкиназу С [1]. Предполагается, что метилирование фосфатидилэтаноламина, приводящее к образованию фосфатидилхолина, усиливается в ответ на действие гормонов и что этот эффект входит в цепь событий, которые сопровождают стимуляцию клетки [2]. Имеются также данные о том, что изменения, происходящие в мембранном бислое (переход фосфолипидных молекул с одной стороны мембраны на другую, избирательный гидролиз фосфолипидов в определенных областях мембраны или образование небислойных липидных фаз), могут быть связаны с процессами слияния клеток, образованием везикул и обновлением мембран. По-видимому, какую-то роль во всем этом играет асимметричное распределение липидов в мембранах, однако точные данные на этот счет пока отсутствуют.

Цель данной главы состоит в том, чтобы дать представление о практических аспектах исследований мембранных липидов. Рассмотренный материал охватывает две области. В пер-

вом разделе мы обсудим основные методы экстракции, разделения и анализа липидов, причем особое внимание уделим современным подходам. Во втором разделе опишем применение этих методов для специальных исследований мембран, включая изучение трансмембранного распределения фосфолипидов и исследование синтеза и внутриклеточного транспорта липидов. Разумеется, материал этой главы является выборочным. Предполагается, что читатель найдет в ней нужную методическую информацию, чтобы затем со знанием дела приступить к исследованию мембранных липидов и при необходимости приспособить эти методики для решения тех или иных задач. Биофизические подходы к изучению липидов и липидно-белковых взаимодействий описаны в гл. 8.

2. Экстракция липидов

При экстракции необходимо извлечь мембранные липиды количественно, не допуская загрязнения препарата нелипидными компонентами. Липиды удерживаются в мембране за счет различных сил — водородных связей, гидрофобных взаимодействий и электростатических сил, поэтому приходится прибегать к использованию полярных растворителей, таких, как метанол или этанол, которые разрушают мембранные структуры и денатурируют мембранные белки. Чаще всего для экстракции мембранных липидов используют смеси растворителей, содержащие хлороформ и метанол; впервые соответствующие методики были описаны в работе [3]. Получаемый экстракт может быть загрязнен веществами нелипидной природы, и для их удаления его следует промыть. Для экстракции липидов из тканей используют различные методики. Ниже описаны те из них, которые чаще всего применяются для извлечения мембранных липидов. Выбор методики зависит главным образом от того, находится ли экстрагируемая мембрана в виде осадка, концентрированной суспензии или разбавленной взвеси.

2.1. Растворители и аппаратура

Все процедуры по экстракции липидов следует проводить в стеклянной посуде, применяя перегнанные растворители или растворители квалификации ЧДА. Для измерения объема растворителей и отбора проб липидных экстрактов следует использовать стеклянные дозаторы или стеклянные пипетки. Для измерения объема липидных экстрактов можно использовать также автоматические пипетки, однако сначала следует убедиться в точности калибровки пипеток применительно к используемым растворителям, а также в том, что из пластиковых наконечников не экстрагируются посторонние вещества.

Многие липиды имеют двойные связи и, следовательно, подвержены перекисному окислению. Чтобы избежать окисления, следует применять перегнанные растворители, а при экстракции сильно ненасыщенных липидов из растворителя должен быть удален кислород путем пробублькивания азота. Экстракцию следует проводить при комнатной или более низкой температуре. Липиды не рекомендуется оставлять в сухом состоянии даже на короткое время, они должны быть растворены в органическом растворителе. Хранить экстракты необходимо в холодильнике в посуде из темного стекла или в сосуде, обернутом алюминиевой фольгой. Если хранение должно быть длительным или если в экстракте присутствуют сильно ненасыщенные липиды, то в качестве антиоксиданта следует добавить бутилированный гидрокситолуол до концентрации 0,05%.

2.2. Экстракция осадка мембран или небольших объемов концентрированных суспензий

1. Ресуспендируют мембранный осадок или диспергируют имеющуюся суспензию в стеклянных центрифужных пробирках, содержащих не менее 20 объемов смеси хлороформ/метанол (2:1, о/о). Если мембраны выделены из гомогенизированных тканей и легко ресуспендируются, обычно нет необходимости дополнительно гомогенизировать тканевой экстракт. Однако при диспергировании мембранных препаратов в смеси хлороформ/метанол образуются сгустки. Такие препараты лучше экстрагировать, добавив сначала один метанол в требуемом количестве, затем диспергировать смесь на вортексе или аналогичном встряхивателе или, если этого недостаточно, на гомогенизаторе типа Polytron или Ultraturax (см. гл. 1) и лишь после этого добавить хлороформ в объеме, необходимом для получения смеси хлороформ/метанол конечного состава 2:1.

При добавлении двадцати объемов смеси хлороформ/метанол на один объем осадка или суспензии мембран должна образоваться гомогенная однофазная суспензия. Если же получаются две фазы, то следует добавить еще некоторый объем смеси хлороформ/метанол (2:1) и хорошо перемешать до тех пор, пока не образуется одна фаза.

2. Накрывают пробирки, чтобы предотвратить испарение, и оставляют экстракт не менее чем на 15 мин (при необходимости время можно увеличить); удаляют денатурированный белок центрифугированием и сливают надосадочную жидкость в стеклянные центрифужные пробирки.

3. Добавляют к экстракту одну пятую объема 0,05 М CaCl_2 и тщательно перемешивают на встряхивателе типа вортекс или с помощью стеклянной палочки, сплюсненной на конце.

При этом должна образоваться однородная эмульсия. Для разделения на две фазы ее оставляют отстаиваться или центрифугируют на настольной центрифуге.

4. С помощью пастеровской пипетки осторожно удаляют верхнюю фазу, которая состоит из смеси хлороформ/метанол/вода, 3:42:47. Нижняя фаза состоит главным образом из хлороформа и содержит все липиды, за исключением ганглиозидов. Последние остаются в верхней фазе, из которой их можно выделить диализом против воды с последующей лиофилизацией.

5. Нижнюю фазу можно промыть, добавив равный объем смеси метанол/вода (1:1), смешав и отцентрифугировав для разделения фаз.

Следует ли промывать липидный экстракт и если да, то сколько раз — зависит от задач конкретного исследования. Например, если определяют включение в липиды радиоактивных предшественников (скажем, пальмитоил-CoA, S-аденозилметионина, холина или этаноламина), то в липидный экстракт может попасть значительное количество радиоактивного субстрата. В этом случае целесообразно промыть экстракт. Напротив, если необходимо экстрагировать липиды с высоким выходом, а небольшое присутствие водорастворимых примесей не имеет существенного значения, то после первоначального разделения фаз и удаления верхней фазы нет необходимости промывать экстракт. То небольшое количество верхней фазы, которое остается после ее удаления, можно диспергировать в нижней фазе, добавив несколько капель метанола.

2.3. Подкисление растворителя для липидной экстракции

Кислые фосфолипиды, свободные жирные кислоты и полифосфоинозитиды не удастся извлечь полностью смесью хлороформ/метанол. Для полной экстракции этих липидов к смеси растворителей необходимо добавить HCl до концентрации 0,25%. В принципе такую систему можно использовать для экстракции во многих случаях. Однако следует иметь в виду, что при этом происходит кислотный гидролиз плазмалогенов, и если предстоит исследовать именно эти липиды, то кислоту нельзя добавлять в растворитель, используемый для их экстракции.

2.4. Экстракция больших объемов мембранной суспензии

Большие объемы водных суспензий мембран лучше всего экстрагировать, используя методику, описанную в работе [4].

1. К 8 мл мембранной суспензии добавляют 30 объемов

смеси хлороформ/метанол (1 : 2) и перемешивают до образования гомогенной суспензии. Если при этом образуется объемный осадок, его следует удалить фильтрованием или центрифугированием. Если же осадка мало, то его можно удалить позже при отделении верхней фазы.

2. Добавляют 10 мл хлороформа и 10 мл воды, перемешивают и либо оставляют смесь до разделения фаз, либо центрифугируют, чтобы ускорить разделение.

3. Удаляют с помощью пастеровской пипетки верхнюю фазу вместе с остатком денатурированных белков, находящихся на границе раздела фаз. Нижняя фаза содержит все липиды, кроме ганглиозидов.

2.5. Удаление растворителя из липидного экстракта

Небольшие объемы хлороформа лучше всего удалить из липидного экстракта в потоке азота в вытяжном шкафу. Для этой цели очень хорошо подходит концентратор образцов типа Techne SC3 (рис. 4.1). Липидные экстракты заливают в подходящие по размеру стеклянные сосуды (пробирки или флаконы), которые помещают в термостатируемый нагревательный блок. Поток азота или сжатого воздуха направляют через подходящим образом расположенные иглы на поверхность каждого экстракта. Используя этот аппарат, можно одновременно концентрировать или высушивать 48 образцов, каждый из которых содержит до 10 мл хлороформа. Можно собрать подобную установку, используя плоский нагреватель, нагревательный блок или водяную баню и направляя азот в каждую пробирку или флакончик через систему пастеровских пипеток, подсоединенных через общую разводку к баллону с газом. С помощью такого устройства можно быстро упарить растворитель; однако образцы не следует нагревать выше 40—50 °С, если затем предполагается дальнейшее исследование липидов.

Большие объемы хлороформа лучше всего удалять из липидных экстрактов с помощью имеющихся в продаже роторных испарителей. Эта операция обычно занимает много времени, особенно если предстоит упаривать большое число образцов. На рис. 4.2 показана другая система, которую можно использовать для концентрирования экстрактов объемом около 100 мл. Это простое устройство легко изготовить в любой стеклотрувной мастерской.

1. Переносят липидный экстракт в грушевидную колбу с шлифовым соединением.

2. Подсоединяют ее к первой ловушке, которая связана с конической колбой, подключенной к вакуумному водоструйно-

му насосу. Подсоединение следует проводить при работающем насосе.

3. Осторожно перемешивая содержимое колбы вращательными движениями, нагревают ее в водяной бане для испарения растворителя. При бурном вскипании раствора весь липидный экстракт, попавший в первую ловушку, стекает обратно в грушевидную колбу, тогда как пары растворителя попадают в охлаждаемую коническую колбу и конденсируются.



Рис. 4.1. Прибор для концентрирования образцов типа Techne SC3. Он состоит из нагревательного блока со сменными насадками, предназначенными для пробирок и флаконов разного размера. Растворитель испаряют в потоке азота, направляемом через иглы, число и положение которых можно регулировать в зависимости от количества образцов.

4. Отсоединяют грушевидную колбу при подключенном вакууме, чтобы предотвратить засасывание в нее воды из насоса.

Необходимо принять меры предосторожности на случай разрыва колбы под вакуумом. Используя это устройство, можно быстро упарить досуха в грушевидных колбах большое число липидных экстрактов. Экстракт затем растворяют в небольшом объеме хлороформа или смеси хлороформ/метанол (1:1) и хранят до последующего исследования в колбе или переносят в другой сосуд.

3. Разделение липидов по классам

Для разделения и анализа липидов предложено много методов, включая фракционирование по растворимости в различных растворителях, колоночную хроматографию на силикагеле и оксиде алюминия, тонкослойную хроматографию (ТСХ) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). Здесь нет возможности детально рассмотреть все методы; для этого читателю следует обратиться к соответствующим пособиям [5—7]. Как правило, при мембранных исследованиях имеют дело с относительно небольшими количествами липидов. По

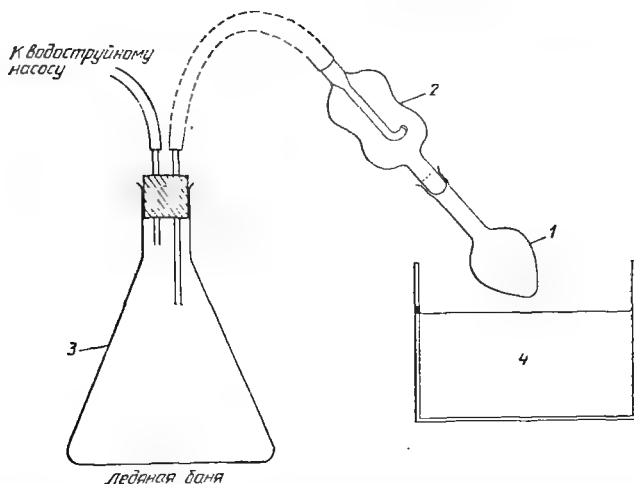


Рис. 4.2. Приспособление для испарения растворителей из липидных экстрактов. Оно состоит из грушевидной колбы (1) на шлифе, соединенной с ловушкой (2), которая с помощью шланга связана с вакуумным водоструйным насосом через охлаждаемую колбу (3). Липидный экстракт вносят в грушевидную колбу, которую нагревают в водяной бане (4) при осторожном перемешивании. Растворитель испаряется и конденсируется в охлаждаемой колбе, а липиды остаются в грушевидной колбе.

этой причине для разделения мембранных липидов чаще всего применяют ТСХ на силикагеле. Этот метод, довольно быстрый и чрезвычайно удобный, дает возможность проводить как качественный, так и количественный анализ липидов различных классов. Поэтому ниже мы рассмотрим вопросы практического применения ТСХ и укажем ряд систем, используемых для анализа мембранных липидов. Кроме того, мы опишем методы разделения полифосфоинозитидов и инозитолфосфатов, а также продуктов метилирования фосфатидилэтаноламина, учитывая важность этих липидов в исследовании мембран.

3.1. Общие вопросы применения ТСХ

3.1.1. Аппаратура

1. *Хроматографические пластинки.* ТСХ обычно проводят в тонком слое силикагеля, нанесенном на подложку — стеклянную, пластиковую или алюминиевую пластинку. Можно использовать и другие адсорбенты, например оксид алюминия, целлюлозу или сефарозу. Силикагель бывает с кальциевой связующей добавкой (силикагель G) или без нее (силикагель H). В продаже имеется большой выбор готовых к употреблению пластинок разного размера (например, Merck, Analabs). Хроматографические пластинки можно приготовить и прямо в лаборатории с помощью специальных приспособлений, таких, как аппликатор типа Desaga (Brinkman Instruments). Однако если не предполагается использовать какие-то уникальные адсорбенты или если для анализа не нужно много пластинок, то вряд ли целесообразно самому заниматься их изготовлением; лучше купить готовые. В тех случаях, когда это заранее не оговорено, все хроматографические анализы, описанные ниже, проведены на пластинках размером 20×20 см в слое силикагеля H толщиной 0,25 мм, иногда с добавлением флуоресцентного индикатора F254 (силикагелевые пластинки фирмы Merck типа 60F254 или пластинки с силикагелем H фирмы Analab).

2. *Хроматографические камеры.* Для разделения используют прямоугольные камеры. Стенки камеры выстилают изнутри фильтровальной бумагой, чтобы ускорить ее насыщение парами растворителя. Если атмосфера внутри камеры не насыщена и растворитель испаряется из слоя адсорбента в процессе восходящей хроматографии, может ухудшиться воспроизводимость результатов. Камеру следует подготовить по крайней мере за час до проведения хроматографии, залив в нее достаточное количество растворителя (см. ниже) на глубину около 1,5 см. Фильтровальная бумага, выстилающая стенки камеры, должна пропитаться растворителем. Необходимо, чтобы крышка ка-

меры плотно прилегала к краям; для этого их необходимо смазать вазелиновой смазкой. Крышку можно снимать только на короткое время, чтобы поместить пластинку, затем камеру необходимо плотно закрыть. В продаже имеются разные камеры. У некоторых из них есть желобки, предназначенные для размещения большого числа пластинок. Однако, по нашему мнению, если пластинки расположены слишком близко друг к другу, то не удастся добиться качественного и воспроизводимого разделения липидов. В одну камеру следует одновременно помещать не более двух пластинок, причем так, чтобы поверхность подложки была обращена в сторону выстилающей камеру бумаги, а слой адсорбента находились на максимальном удалении друг от друга. Слой адсорбента не должен соприкасаться с боковыми стенками камеры, в противном случае растворитель будет подниматься быстрее по краям пластинки, что приведет к искривлению фронта растворителя. При этом липидные пятна будут смещаться к центру и перекрываться вместо того, чтобы равномерно мигрировать вверх по пластинке.

3.1.2. Нанесение образцов

Для хорошего разделения липидов, особенно в условиях повышенной влажности и температуры, рекомендуется активировать хроматографические пластинки, прогрев их при 110°C в течение 30 мин. После охлаждения образцы, предназначенные для разделения, наносят на расстоянии приблизительно 2,5 см от края пластинки. Чтобы свести к минимуму растекание растворителя по адсорбенту, липиды следует растворить в достаточно полярном растворителе, например в смеси хлороформ/метанол (1:1). При этом уменьшается размер пятна и улучшается разделение. В соответствии с числом образцов, подлежащих разделению, тонкослойные пластинки можно аккуратно расчертить мягким карандашом, стараясь не повредить слой адсорбента. Перед нанесением пластинку покрывают пластиковым экраном, оставляя открытым только ее нижний край, и наносят образцы в виде поперечной линии у основания каждой размеченной полоски. Для этого пользуются гамилтоновским шприцем, микропипеткой с тонким наконечником или стеклянным капилляром (рис. 4.3). При необходимости липидный раствор можно нанести повторно вдоль той же линии, предварительно подсушив первый слой. Следует быть очень осторожным и не повредить слой адсорбента; в поврежденном слое нарушается равномерность движения растворителя вверх по пластинке и ухудшается качество разделения. Некоторые исследователи наносят липидный экстракт в виде перекрываю-

щихся небольших пятен, а не в виде одной линии. Однако с приобретением необходимого навыка удастся нанести липидный раствор одной тонкой линией с помощью шприца или пипетки. Количество липида, наносимого на тонкий слой стандартной толщины (0,25 мм), меняется от опыта к опыту. Для ориентировки скажем, что фосфолипидную фракцию микросомных липидов можно удовлетворительно разделить, когда на полосу адсорбента шириной около 5 см наносят до 2 мг липида (~2 мкмоль). Фосфатидилхолин, на долю которого приходится 50% микросомных липидов, концентрируется в этих условиях в виде интенсивной полосы, четко отделяясь от других фосфолипидов, присутствующих в образце.

1. *Использование стандартов.* Если использовать пластинки одного типа и проводить разделение в одной и той же системе растворителей, то относительное положение липидов будет воспроизводиться достаточно хорошо, однако значения R_f будут несколько различаться для разных пластинок. Поэтому одновременно с липидным экстрактом на каждую пластинку следует нанести чистые образцы всех исследуемых липидов. При этом обычно наносят около 10 мкг каждого липида в 10 мкл растворителя в виде пятен, находящихся по краям хроматографической пластинки (рис. 4.3).

2. *Разделение липидов (проявление тонкослойных пластинок).* Прежде чем начинать разделение, необходимо убедиться, что растворитель полностью испарился из нанесенных образцов. Поскольку липиды в сухом состоянии нестабильны из-за их чувствительности к окислению, разделение следует начинать сразу же после испарения растворителя.

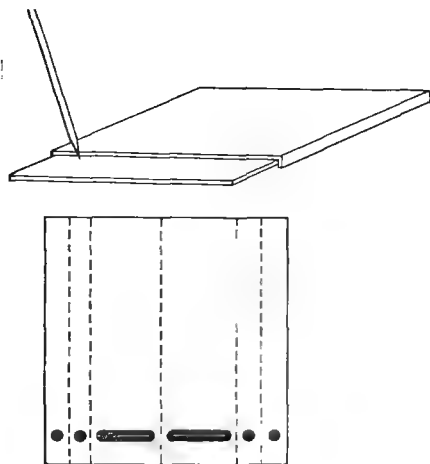


Рис. 4.3. Нанесение образцов на пластинки для ТСХ. В верхней части рисунка показана пластинка для ТСХ, покровная пластинка и микропипетка, используемая для нанесения образца. В нижней части показан типичный вид пластинки до разделения. Стандарты наносят в виде пятен на крайние дорожки адсорбента, осторожно отмеченные мягким карандашом, а липидный экстракт — в виде полос на внутренние дорожки. Возможны различные варианты нанесения образцов в зависимости от числа стандартов и подлежащих разделению образцов.

В зависимости от размера хроматографической камеры берут 80—150 мл системы растворителей (см. ниже), выжидают, пока в камере не установится равновесие, и помещают в нее пластинки. Уровень растворителя должен быть приблизительно на 1 см ниже уровня нанесенных образцов. Разделение заканчивают, когда фронт растворителя доходит до уровня на 1—2 см ниже верхнего края пластины. Пластинку вынимают из камеры, осторожно отмечают карандашом фронт растворителя и высушивают в вытяжном шкафу.

3.1.3. Двумерная ТСХ

При разделении смеси липидов сложного состава (например, при отделении лизофосфолипидов от исходных негидролизированных липидов) может возникнуть необходимость в использовании двух систем растворителей и проведении двумерной хроматографии.

1. Наносят образец в одном углу пластинки и проводят разделение в первой системе растворителей, так чтобы пятна расположились вдоль одного края пластинки.

2. Высушивают пластинку, поворачивают ее на 90°, так чтобы пятна располагались внизу, и проводят разделение во второй системе растворителей (рис. 4.4). Образцы стандартных липидов не удается элюировать в двух направлениях одновременно с анализируемой липидной смесью. Но относительное положение различных липидов можно определить, «прогоняя» стандартные образцы по краям пластинки в каждой системе растворителей (рис. 4.4).

3.2. Системы растворителей для разделения мембранных липидов

В мембранах могут содержаться неполярные липиды (холестерол, эфиры холестерина, три-, ди- и моноацилглицеролы) и полярные (фосфолипиды и гликолипиды). Неполярные липиды являются минорными компонентами мембран; исключение составляет холестерол. Часто неполярные липиды, обнаруживаемые в мембранной фракции, не входят в состав мембран, а захватываются мембранными везикулами при выделении мембран. Например, триацилглицеролы, секретируемые печенью, захватываются цистернами эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (гл. 1). Ни в одной системе растворителей нельзя разделить все классы липидов. Обычно выбирают такую систему, которая удовлетворяет задачам исследования, а если необходим полный анализ липидов, то используют несколько систем растворителей.

Наиболее важными для разделения липидов характеристиками системы растворителей являются результирующая полярность смеси и ее кислотность/основность. Ниже мы рассмотрим несколько систем, предназначенных для специальных целей (см. рис. 4.5 и табл. 4.1). Приведенные примеры в основном охватывают тот круг проблем, которые возникают при исследовании мембранных липидов, и иллюстрируют возможности метода. Однако этот список является выборочным и в литературе сообщается о многих других системах. Заинтересованный читатель может обратиться к работе [7], а также к работам, упомянутым в руководствах [5, 6].

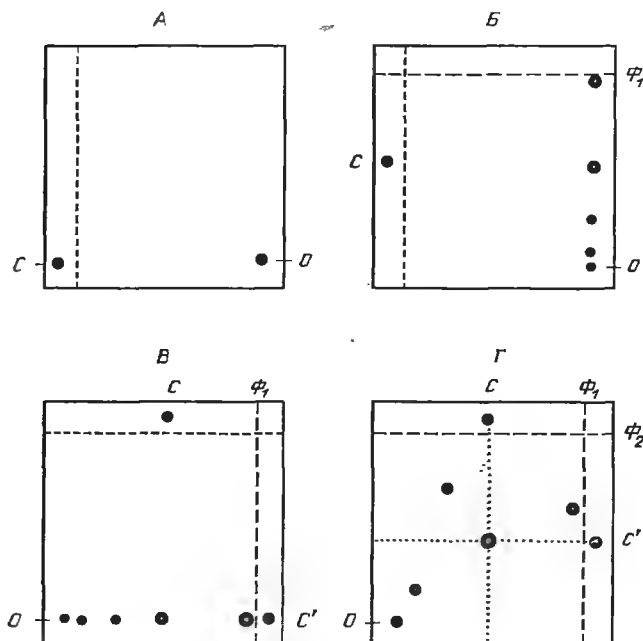
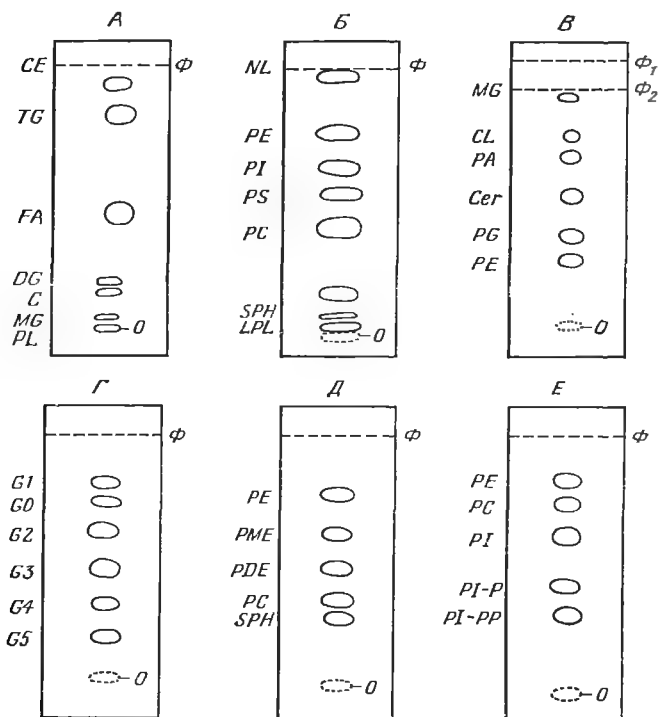


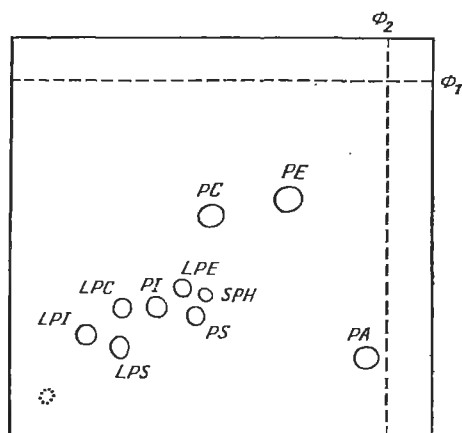
Рис. 4.4. Двумерная ТСХ. А. Разделяемые липиды наносят в виде пятна в правом нижнем углу пластинки. В левой части пластинки осторожно отмечают карандашом дорожку для стандартного образца С. Б. Положение липидов после хроматографии в первом направлении. В. Пластинку поворачивают на 90° , так что ее правый край оказывается внизу. Отмечают вторую дорожку и наносят тот же стандарт С'. Г. При разделении во второй системе растворителей липиды поднимаются вверх по пластинке. Положение стандарта отмечено на пересечении пунктирных линий. Штриховые линии Φ_1 и Φ_2 указывают положение фронта растворителя в системах 1 и 2 соответственно. 0 — исходное положение нанесенного образца.



Ж

2

1



3.2.1. Разделение неполярных липидов

Неполярные липиды разделяют в тонком слое силикагеля, используя систему растворителей, состоящую из гептана (или легкого петролейного эфира 40—60), диэтилового эфира и ледяной уксусной кислоты (60:40:2, о/о). Фосфолипиды остаются на старте, а другие липиды распределяются так, как показано на рис. 4.5, А.

3.2.2. Разделение основных классов фосфолипидов

Фосфолипиды разделяют в тонком слое силикагеля, используя систему растворителей хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (60:50:1:4, о/о). Эту систему можно использовать для разделения фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, фосфатидилхолина и сфингомиелина (рис. 4.5, Б). Лизофосфолипиды остаются вблизи старта и не полностью отделяются друг от друга. Кардиолипин (митохондриальный фосфолипид) и другие кислые фосфолипиды мигрируют быстрее фосфатидилэтаноламина. Неполярные липиды перемещаются с фронтом растворителя. Если они мешают исследованию, то их можно переместить к самому краю пластинки. Для этого после высушивания следует провести повторное элюирование эфиром в том же направлении до уровня на 2—3 см выше фронта первого растворителя.

3.2.3. Разделение кислых фосфолипидов

Системы для разделения кислых фосфолипидов с двукратным элюированием в одном направлении описаны в работе [8]. После нанесения липидов проводят разделение в смеси аце-

Рис. 4.5. Системы для разделения липидов методом ТСХ на силикагеле Н. А. Гептан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота, 60:40:2. Б. Хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода, 60:50:1:4. В. Ацетон/легкий петролейный эфир, 1:3, до положения фронта F_1 , затем хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода, 80:13:8:0,3, до положения фронта F_2 . Г. Пропанол/вода, 7:3. Д. н-Пропанол/пропионовая кислота/хлороформ/вода, 3:2:2:1. Е. Метанол/хлороформ/аммиак/вода, 48:40:5:10. Ж. Разделение фосфолипидов и лизофосфолипидов при двумерной ТСХ. Система 1, хлороформ/метанол/аммиак, 65:35:5, до фронта F_1 . Система 2, хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода, 10:2:4:2:1. TG — триацилглицеролы; DG — диацилглицеролы; MG — моноацилглицеролы; С — холестерол; CE — эфиры холестерола; FA — жирные кислоты; PL — фосфолипиды; NL — нейтральные липиды; PE — фосфатидилэтаноламин; PI — фосфатидилинозитол; PS — фосфатидилсерин; PC — фосфатидилхолин; SPH — сфингомиелин; LPL — лизофосфатидилхолин; PG — фосфатидилглицерол; Cer — церамидмоногексозы; PA — фосфатидная кислота; CLP — кардиолипин; PME — фосфатидилмонометилэтаноламин; PDE — фосфатидилдиметилэтаноламин; PI-P — фосфатидилинозитолмонофосфат; PI-PP — фосфатидилинозитолдифосфат; G0—G5 — ганглиозиды; LPC — лизофосфатидилхолин; LPE — лизофосфатидилэтаноламин; LPS — лизофосфатидилсерин; LPI — лизофосфатидилинозитол.

Таблица 4.1. Системы растворителей, используемые для разделения мембранных липидов

Разделение нейтральных липидов

Гептан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота, 60 : 40 : 1

Гептан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота, 80 : 20 : 1

Разделение фосфолипидов

Хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода, 25 : 15 : 4 : 2

Хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода, 60 : 50 : 1 : 4

н-Пропанол/пропионовая кислота/хлороформ/вода, 3 : 2 : 2 : 1

Разделение кислых фосфолипидов

Система 1: ацетон/легкий петролейный эфир, 1 : 3

Система 2: хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода, 80 : 13 : 8 : 0,3

Обе системы растворителей используют в одном направлении.

Разделение полифосфоинозитидов

н-Пропанол/4 М аммиак, 2 : 1

Хлороформ/метанол/4 М аммиак, 9 : 7 : 2

Хлороформ/метанол/28%-ный аммиак/вода, 40 : 48 : 5 : 10

Разделение ганглиозидов

Хлороформ/метанол/2,5 М аммиак, 60 : 40 : 9

Пропанол/вода, 7 : 3

Системы для разделения фосфолипидов в двух направлениях

Направление 1

Хлороформ/метанол/аммиак

65 : 35 : 5

Хлороформ/метанол/аммиак

90 : 54 : 11

Хлороформ/метанол/уксусная кислота/вода, 50 : 20 : 7 : 3

Направление 2

Хлороформ/метанол/ацетон/уксусная кислота/вода, 10 : 2 : 4 : 2 : 1

Хлороформ/метанол/уксусная кислота/вода, 90 : 40 : 12 : 2

Хлороформ/метанол/40%-ный водный метиламин/вода, 13 : 7 : 1 : 1

тон/легкий петролейный эфир (1 : 3, о/о). Подсушивают пластинку, обдувая ее азотом, а затем элюируют в том же направлении смесью хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (80 : 13 : 8 : 0,3, о/о). В первой системе растворителей неполярные липиды перемещаются к верхнему краю пластинки, что позволяет предотвратить их перекрывание с кислыми фосфолипидами. Используя этот подход, можно разделить кардиолипин, фосфатидовую кислоту, церамидмоногексозиды, фосфатидилглицерол и фосфатидилэтаноламин (рис. 4.5, В).

3.2.4. Разделение фосфолипидов и лизофосфолипидов

Чтобы разделить смесь лизофосфолипидов и фосфолипидов, образующихся, например, после обработки мембран фосфолипазой А, необходимо использовать двумерную ТСХ. Для разделения подходят две системы: хлороформ/метанол/аммиак (65 : 35 : 5, о/о) и хлороформ/метанол/ацетон/уксусная кислота/вода (10 : 2 : 4 : 2 : 1, о/о) (рис. 4.5, Ж). Стандартные об-

разцы следует хроматографировать по крайней мере в первом направлении, чтобы уточнить локализацию изучаемых липидов. Для идентификации липидов можно также использовать специфические красители (см. ниже).

3.2.5. Разделение ганглиозидов

Ганглиозиды — минорные компоненты мембран, играющие важную роль в осуществлении некоторых мембранных функций. Они представляют собой сложные цереброзиды, в которых керамидный фрагмент связан с углеводным, содержащим остатки глюкозы, галактозамина и сиаловой кислоты. Имеется много типов ганглиозидов, различающихся по структуре углеводной части, но их детальное рассмотрение не входит в задачи этого раздела. Системы растворителей, пригодные для разделения ганглиозидов, включают смеси пропанол/вода (7:3, о/о) (рис. 4.5, Г) или хлороформ/метанол/2,5 М аммиак (60:4:9, о/о). Системы, содержащие кислоты, использовать не следует, поскольку они вызывают разложение ганглиозидов.

3.2.6. Разделение промежуточных продуктов, образующихся при метилировании фосфатидилэтаноламина до фосфатидилхолина

Метилирование фосфатидилэтаноламина, как полагают, происходит при опосредуемом рецепторами отклике ряда клеток на гормоны. Фосфатидилэтаноламин, фосфатидилмонометилэтаноламин, фосфатидилдиметилэтаноламин и фосфатидилхолин разделяют на силикагеле, используя систему растворителей н-пропанс/пропионовая кислота/хлороформ/вода (3:2:2:1, о/о) (рис. 4.5, Д). Эта система пригодна также для разделения основных классов фосфолипидов, которые образуют в ней узкие полосы. Недостаток системы состоит в том, что разделение на пластинке длиной 20 см длится примерно 4 ч, тогда как для систем, указанных выше, на это уходит 1,5—2 ч.

3.3. Разделение полифосфоинозитидов и их производных

Полифосфоинозитиды играют главную роль при передаче сигналов в ответ на действие гормонов, нейромедиаторов и ростовых факторов. Первая реакция на гормон или лиганд состоит в ускорении гидролиза фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата до диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трисфосфата (рис. 4.6). Оба они функционируют как вторичные посредники: диацилглицерол активирует протеинкиназу С, а инозитол-трисфосфат мобилизует кальций из мембраносвязанных де-

по, таких, как цистерны эндоплазматического ретикулума [1]. Инозитолтрисфосфат подвергается дальнейшему гидролизу, давая инозитолбисфосфат, инозитолмонофосфат и, наконец, инозитол. Последний затем включается в фосфатидилинозитол, который фосфорилируется с образованием сначала фосфатидилинозитол-4-фосфата, а затем фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (см. Приложение IV).

Три указанных выше фосфоинозитида можно разделить с помощью ТСХ суммарных фосфолипидов. Другой подход состоит в щелочном гидролизе фосфолипидов с последующим разделением образовавшихся инозитолфосфатов с помощью хроматографии на бумаге или ионообменной хроматографии,

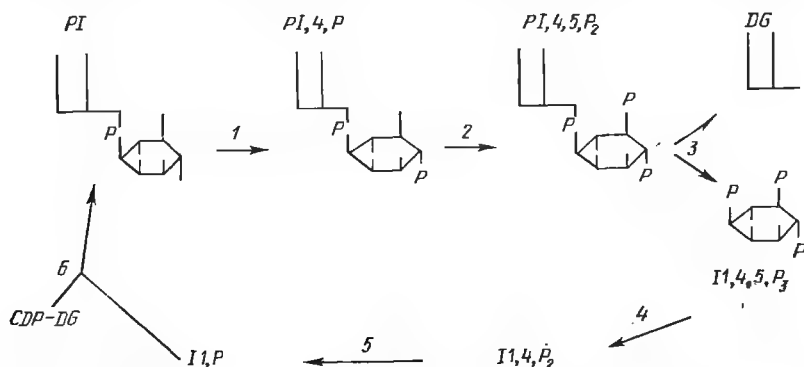


Рис. 4.6. Взаимопревращения полифосфоинозитидов (детали см. в тексте).

Предполагаемая стадия активации гормонами представлена реакцией 3.

включая ВЭЖХ. Выбор метода зависит от задач исследования. Во многих экспериментах фосфолипиды метят с помощью [^{32}P]- или [^{14}C]-инозитола. Далее нужные липиды можно идентифицировать по радиоактивной метке и путем сравнения с аутентичными стандартными образцами.

3.3.1. Тонкослойная хроматография полифосфоинозитидов

Ионы кальция затрудняют миграцию фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата [9] при ТСХ, поэтому для разделения полифосфоинозитидов необходимо использовать пластинки с силикагелем Н. Если пластинки готовят в лаборатории, следует использовать силикагель Н, содержащий 1% оксалата калия в качестве хелатирующего агента [9]. На пластинках с силикагелем Н в системе растворителей метанол/хлороформ/аммиак/вода (48:40:5:10, о/о) или н-пропанол/4 н. гидроксид аммония (2:1, о/о) удастся отделить фосфатидилинозитол-4-фос-

фат и фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат от других фосфолипидов (рис. 4.5). При этом фосфатидилинозитол перекрывается со сфингомиелином, фосфатидилсерином, фосфатидилэтаноламином и фосфатидной кислотой. Если фосфатидилинозитол необходимо отделить, пятно, содержащее этот липид, выскребают с пластинки, липиды элюируют (см. ниже), вновь наносят их на хроматографическую пластинку и разделяют, используя одну из систем, описанных выше. Предложен и другой вариант, при котором фосфоинозитиды и фосфолипиды разделяют с помощью двумерной хроматографии. В первом случае используют смесь хлороформ/метанол/28%-ный аммиак (65:38:8, о/о), а во втором — смесь бутанол/вода/ледяная уксусная кислота (6:1:1, о/о) [10].

3.3.2. Разделение инозитолфосфатов после щелочного гидролиза

Изложенная ниже методика анализа фосфоинозитидов и разделения инозитолфосфатов основана на работе Бэллоу и др. [11, 12] с модификациями Элліса [13], Даунса и Мичелла [14] и описана Ирвином и др. [15] применительно к выделению инозитолфосфатов из фосфоинозитидов мозга.

Здесь дается один из вариантов методики. При необходимости ее можно модифицировать для анализа меньших количеств образца.

А. Щелочной гидролиз

1. Липиды в количестве, эквивалентном 10 мг липидного фосфора, смешивают с 12 мл 1 М КОН и кипятят смесь 30 мин.

2. Охлаждают смесь и доводят рН до 3,0 добавлением муравьиной кислоты. Удаляют жирные кислоты, образовавшиеся при щелочном гидролизе, промыв смесь несколько раз гептаном.

Б. Хроматография инозитолфосфатов на колонке с дауэксом

1. Доводят рН раствора до 8,0 добавлением аммиака и наносят его на колонку размером 1,5×3 см с дауэксом 1×8—400 в формиатной форме.

2. Последовательно элюируют колонку каждым из перечисленных ниже растворов порциями по 15 мл:

- а. 0,1 М муравьиная кислота/0,2 М формиат аммония; вымывает инозитолмонофосфаты (преимущественно 1-изомер);
- б. 0,1 М муравьиная кислота/0,4 М формиат аммония; вымывает инозитолбисфосфаты (преимущественно 1,5- и 4,5-изомеры);
- в. 0,1 М муравьиная кислота/1,0 М формиат аммония; вымывает инозитолтрисфосфаты (преимущественно 1,4,5- и 2,4,5-изомеры).

В принципе существует большое число изомерных инозитолфосфатов. Однако изомеры, выделяемые из мозга, состоят преимущественно из 4,5-бисфосфатов и 1,4,5-трисфосфатов.

3. Обессоливают элюанты добавлением дауэкса 50Н⁺ (смола затем удаляют фильтрованием). Экстракты можно лиофилизовать и хранить при —20 °С.

В. Хроматография инозитолфосфатов на бумаге. Инозитолфосфаты можно разделить с помощью нисходящей хроматографии на бумаге ватман № 1, используя систему растворителей изопропанол/насыщ. аммиак/вода (7:5:2, о/о). После элюирования в течение 5—10 сут значения R_f для трех инозитолфосфатов составляют: инозитолмонофосфат 0,6; инозитолбисфосфат 0,35; инозитолтрисфосфат 0,16 [11]. Инозитолфосфаты выявляют с помощью следующей процедуры.

1. Смешивают 5 мл 60%-ной хлорной кислоты с 10 мл 1 М НСl и 25 мл 4%-ного (в/о) молибдата аммония.
2. Водой доводят объем до 100 мл.
3. Опрыскивают хроматограмму этим реагентом.
4. Подсушивают бумагу при комнатной температуре и помещают ее под сильный источник УФ-излучения.
5. Фосфатсодержащие области обнаруживаются в виде голубых пятен или полос.

3.3.3. Анализ инозитолфосфатов, продуцируемых клетками в экспериментальных условиях (см. также Приложение VI)

Инозитолтрисфосфаты играют во многих клетках важную роль вторичных посредников. Поэтому часто бывает необходимо в ходе эксперимента определять не фосфолипиды, а сами фосфорилированные полиолы. Легче всего это сделать с помощью ионообменных смол типа дауэкс.

1. Останавливают исследуемую реакцию добавлением ТХУ (до 10%) и удаляют денатурированные белки центрифугированием.

2. Отбирают пробы по 1,0 мл из супернатанта; нейтрализуют их разбавленным NaOH; доводят объем каждой пробы до 5 мл водой и пропускают через колонку объемом 1 мл с ионообменной смолой типа дауэкс 1×8 200—400 в формиатной форме. Колонки лучше всего делать из пастеровских пипеток одноразового пользования, поместив в их нижнюю часть пробочку из стекловолны.

3. Элюируют три типа инозитолфосфатов порциями растворов по 15 мл, как описано выше.

4. Обессоливают и лиофилизуют выделенные фракции перед дальнейшим исследованием.

5. Фракции растворяют в дистиллированной воде; их можно идентифицировать с помощью бумажной хроматографии (см. выше), а количественное определение провести по радиоактивности или фосфату.

3.4. Обнаружение липидов на пластинках для ТСХ

Рассмотрим несколько методов обнаружения липидов на пластинках для ТСХ. Мы укажем специфические окрашивающие реагенты на липиды вообще, на фосфолипиды, а также на отдельные типы липидов. Многие реагенты наносят на слой адсорбента путем равномерного разбрызгивания. Для этого лучше всего использовать пульверизаторы типа аэрозольных баллончиков. Их можно приобрести у фирм, производящих пластинки для ТСХ. При необходимости часть пластинки при опрыскивании можно прикрыть, чтобы реагент не попал на анализируемые липиды, и окрашивать только стандартные липиды по краям пластинки.

3.4.1. Пары иода

Метод обнаружения липидов, основанный на окрашивании их парами иода, наиболее удобен благодаря своей скорости, универсальности и отсутствию разрушающего действия на липиды. Пластинки после извлечения из хроматографической камеры высушивают в вытяжном шкафу и помещают в закрытую камеру подходящего размера, содержащую несколько кристалликов иода. Эту камеру необходимо подготовить заранее и держать в теплом месте, чтобы произошла сублимация иода. Липиды обнаруживаются в виде коричнево-желтых пятен или полос. Окрашивание может длиться от нескольких минут до нескольких часов в зависимости от количества липидов. Пятна осторожно очерчивают мягким карандашом и ждут, пока улетучится иод. Этот процесс можно ускорить, нагрев пластинку. Поскольку иод тушит флуоресценцию, важно, чтобы пятна обесцветились перед определением радиоактивности липидов в сцинтилляционном счетчике. Оставшиеся следы иода обычно не мешают при колориметрическом анализе липидов.

3.4.2. Обнаружение фосфолипидов

Для обнаружения фосфатсодержащих липидов наиболее пригоден очень чувствительный метод Васьковского и Костецкого [16].

а. Растворяют 16 г молибдата аммония в 120 мл воды.

б. К 40 мл концентрированной HCl добавляют 10 мл ртути и 80 мл раствора а). Встряхивают смесь в течение 30 мин и фильтруют ее.

в. К 200 мл концентрированной H_2SO_4 добавляют весь раствор б) и остаток раствора а). Доводят объем смеси до 1 л; хранят ее в бутылки из темного стекла.

1. После извлечения пластинок из хроматографической камеры дают возможность растворителю полностью улетучиться и равномерно опрыскивают пластинку реагентом в). Поскольку этот реагент обладает коррозионными свойствами, опрыскивание лучше проводить в картонной коробке. Кладут пластинку на дно коробки, находящейся в вытяжном шкафу, опрыскивают пластинку, стараясь держать пульверизатор внутри коробки.

2. Через несколько минут фосфолипидсодержащие пятна окрашиваются в темно-голубой цвет. Эта окраска не мешает при последующем колориметрическом анализе фосфолипидов.

3.4.3. Обнаружение аминогрупп

Фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и другие липиды со свободными аминогруппами можно обнаружить с помощью нингидрина.

1. Высушивают ТСХ-пластинки после извлечения из хроматографической камеры и опрыскивают их 0,25%-ным раствором нингидрина в ацетоне.

2. Аминосодержащие липиды обнаруживаются в виде розово-фиолетовых пятен через 1—2 ч при комнатной температуре и через 15 мин при нагревании пластинок до 100 °С. Работать с нингидриновым реагентом следует в перчатках.

3.4.4. Обнаружение холинсодержащих липидов

Для выявления холинсодержащих липидов, т. е. фосфатидилолина и сфингомиелина, используют реагент Драгендорфа [7]. Готовят следующие растворы.

а. 1,7 г нитрата висмута растворяют в 100 мл 20%-ной уксусной кислоты.

б. 10 г иодида калия растворяют в 25 мл воды.

в. Смешивают 20 мл раствора а) с 5 мл раствора б) и добавляют 70 мл воды. Этой смесью опрыскивают пластинку.

1. После извлечения пластинки из хроматографической камеры ее высушивают и опрыскивают реагентом Драгендорфа.

2. Через несколько минут холинсодержащие липиды выявляются в виде оранжевых пятен или полос.

3.4.5. Обнаружение гликолипидов

Специфическим красителем для гликолипидов, включая цереброзиды, сульфатиды, гликозилдиацилглицериды и ганглиозиды [5], является α -нафтол. Готовят следующие растворы.

а. 0,5 г α -нафтола растворяют в 100 мл смеси метанол/вода (1 : 1).

б. Смешивают 95 мл концентрированной H_2SO_4 с 5 мл дистиллированной воды.

1. После извлечения пластинки из хроматографической камеры ее высушивают и опрыскивают раствором а).

2. Высушивают пластинку на воздухе и опрыскивают ее раствором б), принимая те же меры предосторожности, что и при использовании реагента Васьковского и Костецкого (см. выше).

3. Прогревают пластинку при $120^\circ C$ до появления окрашивания. Гликолипиды окрашиваются в фиолетово-голубой цвет, а другие полярные липиды — в желтый цвет.

3.4.6. Обнаружение ганглиозидов

Ганглиозиды можно выявить с помощью резорцинового реагента [5].

а. Растворяют 2 г резорцинола в 100 мл дистиллированной воды. Этот раствор не разлагается при хранении. Не менее чем за 4 ч до использования добавляют 10 мл этого раствора к 80 мл концентрированной HCl , в которую было добавлено 0,5 мл 0,1 М сульфата меди ($2,5 \text{ г } CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 100 мл воды), и доливают до 100 мл дистиллированной водой.

1. Высушивают пластинку после проявления и опрыскивают ее реагентом а).

2. Накрывают хроматографическую пластинку стеклянной пластинкой такого же размера и нагревают до $120^\circ C$. Ганглиозиды обнаруживаются в виде голубовато-фиолетовых пятен.

4. Количественное определение липидов после разделения их с помощью ТСХ

4.1. Элюирование липидов

Для дальнейшего анализа липиды можно элюировать с тонкослойных пластинок с помощью следующей процедуры.

1. Очерчивают липидное пятно кончиком иглы, острым шпателем или кусочком стекла. Этим же инструментом рассекают пятно горизонтальными и вертикальными линиями.

2. Кладут пластинку на лист бумаги с гладкой поверхностью и с помощью кусочка стекла или шпателя полностью соскребают силикагель из помеченных участков.

3. Собирают в кучку порошок на листе бумаги и, используя его как воронку, переносят силикагель в коническую центрифужную пробирку объемом 15 мл.

4. Элюируют липид растворителем, более полярным, чем тот, который обычно используется при ТСХ данного липида. Для большинства липидов вполне подходит смесь хлороформ/метанол (1 : 1, о/о).

5. Ресуспенсируют силикагель в 15 мл растворителя, тщательно перемешивают на вортексе и осаждают силикагель в настольной центрифуге.

6. Осторожно сливают растворитель или переносят его с помощью пастеровской пипетки в подходящий сосуд.

7. Повторяют экстракцию несколько раз, используя такие же объемы растворителя.

8. Объединяют экстракты и удаляют растворитель (разд. 2.5).

4.2. Определение фосфолипидов

Фосфор, входящий в состав фосфолипидов, можно определить в образцах элюированных липидов или непосредственно на силикагеле без элюирования с помощью следующей процедуры, основанной на методе Фиске и Суббароу [17], модифицированном Бартлетом [18].

Реагенты

а. Хлорная кислота, 7%.

б. Молибдат аммония, 2,5%.

в. Стандартный раствор фосфата: 3,58 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды. Добавляют несколько капель хлороформа, чтобы предотвратить рост микроорганизмов. Непосредственно перед использованием разбавляют этот раствор в 10 раз, чтобы получить концентрацию 1 мкмоль/мл.

г. Реагент, содержащий аминаофтолсульфокислоту. Его можно приобрести или приготовить самим. Для этого смешивают 30 г бисульфата натрия, 5 г сульфита натрия и 0,5 г 1,2,4-аминаофтолсульфокислоты, растирая их в ступке. Растворяют в 250 мл дистиллированной воды, выдерживают 3 ч в темноте, фильтруют и заливают в сосуд из темного стекла. Этот реагент можно хранить в холодильнике в течение 8 нед.

Методика определения

1. Соскребают силикагель, содержащий фосфолипиды (см. выше), и переносят его в пробирку из тугоплавкого стекла. Поскольку метод определения фосфата чрезвычайно чувствителен,

необходимо позаботиться о чистоте пробирок. Их следует мыть только детергентами, не содержащими фосфатов, или дистиллированной водой, в которую добавлено несколько миллилитров концентрированной HCl на 1 л, а затем многократно ополаскивать дистиллированной водой, полученной в стеклянном дистилляторе. Такие же требования предъявляются к чистоте всей используемой стеклянной посуды. Для приготовления растворов тоже следует использовать воду, перегнанную в стеклянном дистилляторе.

2. Наливают под тягой 1,5 мл хлорной кислоты в каждую пробирку, используя стеклянную пипетку с автоматическим дозатором.

3. Прикрывают пробирки стеклянными шариками подходящего размера и прогревают смесь при 230°C в течение времени, вдвое превышающего то, которое требуется для изменения окраски раствора от коричнево-бурого до бесцветного или бледно-желтого (обычно достаточно 30 мин). Эту процедуру можно проводить в нагревательном блоке или в штативе для микроанализа по Къельдалю, но обязательно в вытяжном шкафу. Необходимо проявлять особую осторожность, поскольку при контакте горячей хлорной кислоты с органическими веществами может произойти взрыв.

4. Охлаждают пробирки. Добавляют 2,5 мл дистиллированной воды. Хорошо перемешивают и осаждают силикагель центрифугированием.

5. Осторожно отбирают пастеровской пипеткой надосадочную жидкость и переносят ее в другую пробирку.

6. Добавляют 1,5 мл раствора молибдата аммония и тщательно перемешивают. Добавляют 0,2 мл реагента, содержащего аминафтаолсульфокислоту, и тщательно перемешивают.

7. Прикрывают пробирки шариками и нагревают в течение 9 мин в кипящей водяной бане. Охлаждают пробирки до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность при 830 нм, используя в качестве контроля образец, приготовленный точно таким же образом, но не содержащий фосфата.

8. Используя стандартные растворы, содержащие фосфат в количестве 0—2,0 мкмоль, строят калибровочную кривую; при этом стандартные образцы не сжигают и не центрифугируют. Количество фосфолипида в мкмольях, содержавшееся в сожженном образце, можно определить с помощью этой калибровочной кривой прямо по результатам измерений оптической плотности. Зависимость является линейной до 2,0 мкмоль фосфата; чувствительность метода достигает 0,05 мкмоль.

Чтобы определить количество фосфора в суммарном липидном экстракте или во фракциях, элюированных с ТСХ-пластинок, следует отобрать пробу липидного раствора, испа-

рить растворитель в потоке азота, добавить хлорную кислоту, провести сожжение и определить количество фосфолипида, исключив стадию центрифугирования.

Перед определением фосфолипидов описанным выше методом имеет смысл отобрать пробу силикагеля с используемых тонкослойных пластинок и определить в ней содержание фосфата. Имейте в виду, что пластинки фирмы Merck с силикагелем 60 F254 не содержат фосфата, тогда как пластинки той же фирмы типа силикагель/кизельгур F254 характеризуются высоким содержанием фосфата и их нельзя использовать в данном анализе.

4.3. Определение сложных эфиров

Сложноэфирные группы в три-, ди- и моноацилглицеролах, эфирах холестерина или фосфолипидах определяют по методу Снайдера и Стефенса [19].

Реагенты

а. Растворяют 5 г $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в смеси 10 мл 70%-ной хлорной кислоты и 10 мл дистиллированной воды. Разбавляют раствор холодным абсолютным этанолом до 100 мл и хранят его при 4°C. Раствор не портится в течение нескольких месяцев.

б. Непосредственно перед использованием смешивают 4 мл реагента с 3 мл 70%-ной хлорной кислоты и разбавляют до 100 мл холодным абсолютным этанолом.

в. Растворяют 2 г гидрохлоридгидроксиламина в небольшом объеме воды и разбавляют до 50 мл абсолютным этанолом.

г. Растворяют 4 г NaOH в небольшом объеме дистиллированной воды и разбавляют до 50 мл абсолютным этанолом.

д. Смешивают равные объемы реагентов в) и г). Отфильтровывают смесь и используют фильтрат как реагент д). Реагенты в), г) и е) следует готовить прямо перед использованием.

е. Для приготовления стандартного раствора сложного эфира в хлороформе (1 мкмоль/мл) можно использовать триолеилглицерол или метилстеарат. Учтите, что триацилглицерол, используемый как стандарт, имеет три сложноэфирные группы.

Методика определения

1. Растворяют элюированные липиды в хлороформе и отбирают пипеткой пробы в пробирки. Полностью испаряют растворитель в потоке азота.

2. Добавляют 1 мл реагента д). Прикрывают пробирку шариком и прогревают смесь при 65°C в течение 2 мин в термостате или в водяной бане.

3. Охлаждают пробирки и добавляют 3 мл реагента б). Перемешивают и оставляют на 30 мин до появления розовато-лиловой окраски.

4. Измеряют оптическую плотность при 530 нм относительно контрольного образца.

5. Строят калибровочную кривую, используя стандартные растворы, содержащие сложный эфир в количестве 0—10 мкмоль. Количество три-, ди- и моноацилглицеролов можно определять прямо по калибровочной кривой. Чтобы получить количество этих липидов в микромолях, надо разделить найденное количество микромолей сложного эфира на 3, 2 и 1 соответственно.

Чувствительность метода составляет около 0,05 мкмоль в расчете на сложноэфирную группу. Его можно использовать только после разделения липидов на фракции, поскольку анализ основан на определении сложноэфирных групп, а не отдельных классов веществ.

4.4. Определение холестерина и его эфиров

Холестерол и его эфиры можно определять как в суммарном липидном экстракте, так и в отдельных его фракциях. При анализе нефракционированных липидных экстрактов сначала определяют общий холестерол (т. е. свободный и этерифицированный), а затем осаждают свободный холестерол дигитонином. Этерифицированный холестерол определяют по разности между количеством общего и свободного холестерола.

Реагенты

а. Растворяют 2,5 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 85%-ной ортофосфорной кислоте, так чтобы конечный объем составил 100 мл. Хранят этот раствор в темной посуде при комнатной температуре. При образовании осадка раствор следует выбросить.

б. Разбавляют 4 мл реагента а) концентрированной H_2SO_4 до объема 50 мл. Смесь охлаждают и хранят при комнатной температуре. Если раствор помутнеет, его следует выбросить.

в. Растворяют 1 г дигитонина в 50 мл 95%-ного этанола. Доливают до 100 мл водой. Раствор можно хранить в темной посуде до 6 месяцев.

г. Готовят стандартный раствор, растворив 100 мг холестерола в 100 мл ледяной уксусной кислоты. При анализе разбавляют этот раствор в 10 раз так, что концентрация холестерола становится равной 0,01%, или 0,258 мМ.

Методика определения

1. Пипеткой вносят аликвоты липидных экстрактов в хлороформе в пробирки с пробками. Испаряют растворитель в потоке азота.

2. Добавляют 6 мл ледяной уксусной кислоты, перемешивают и добавляют 4,0 мл реагента б). Перемешивают и через 10 мин измеряют оптическую плотность при 550 нм (пурпурная окраска) относительно контрольного образца.

3. Строят калибровочную кривую, заменив при добавлении ледяной уксусной кислоты часть ее объема стандартным раствором холестерина (0—1,5 мкмоль).

Осаждение свободного холестерина

1. Вносят пипеткой аликвоты липидного экстракта в конические центрифужные пробирки объемом 15 мл. Испаряют растворитель в потоке азота и добавляют 1,0 мл смеси ацетон/95%-ный этанол (1 : 1, о/о).

2. Добавляют 1,0 мл реагента в). Оставляют пробирки на 10 мин.

3. Осаждают образовавшийся осадок центрифугированием при 300 об/мин в течение 5 мин, отбрасывают надосадочную жидкость и дают стечь остаткам жидкости из пробирок в течение 5 мин.

4. Ресуспандируют осадок в 4,0 мл ацетона с помощью вортекса или аналогичного встряхивателя и повторно центрифугируют. Подсушивают в слабом потоке азота.

5. Растворяют осадок в 6 мл ледяной уксусной кислоты и выполняют остальные операции, как при определении общего холестерина.

Калибровочная кривая линейна в диапазоне 0—1,5 мкмоль холестерина; чувствительность метода 0,05 мкмоль холестерина.

Анализ на холестерол широко применяется в клинике, и в продаже имеются аналитические наборы для его определения ферментативным методом с помощью холестеролоксидазы. Этот метод более чувствителен, чем описанный выше колориметрический анализ, однако соответствующие наборы предназначены для исследования образцов сыворотки и мало пригодны для анализа липидов, выделенных из мембран. Аналитические наборы для определения холестерина поставляются такими фирмами, как Boehringer, Sigma и BDH.

4.5. Определение свободных жирных кислот

Колориметрическое определение свободных жирных кислот основано на получении соответствующих солей меди и последующей их реакции с диэтилдитиокарбаматом [20].

Реагенты

а. Растворяют 6,45 г $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл воды. Смешивают 10 объемов полученного раствора с 1 объемом 1 М уксусной кислоты и 9 объемами 1 М триэтаноламина в воде. Смесь следует готовить непосредственно перед использованием

из указанных трех растворов, которые можно хранить длительное время.

6. Растворяют 0,1 г диэтилдитиокарбамата натрия в 100 мл бутанола. Раствор можно хранить при 4°C не более недели.

Методика определения

1. Пипеткой вносят раствор жирной кислоты в хлороформе в пробирки с пробками емкостью 15 мл.

2. Добавляют 2,5 мл реагента а) и перемешивают встряхиванием в закрытой пробирке в течение 2 мин.

3. Разделяют две фазы центрифугированием. Удаляют верхний водный слой с помощью шприца или пастеровской пипетки и отбирают из нижней фазы 3 мл, стараясь не загрязнить аликвоту материалом верхней фазы.

4. Добавляют 0,5 мл реагента б), перемешивают и измеряют оптическую плотность при 440 нм (желтая окраска) относительно контрольного образца.

Калибровочная кривая линейна в диапазоне 0—100 мкг жирной кислоты; чувствительность метода 10 мкг жирной кислоты.

5. Исследование трансмембранного распределения липидов

Изучению трансмембранного распределения липидов посвящено несколько обзоров [21—23]. В них суммирована информация об исследованных мембранных препаратах и использованных методах, но не рассмотрены практические вопросы методики экспериментов. В этом разделе мы детально опишем методы определения трансмембранного распределения липидов на примере микросом печени крысы. Однако эти методы носят универсальный характер и в принципе могут использоваться также для других мембран при условии, что выполнены все необходимые контрольные эксперименты.

При исследовании трансмембранного распределения фосфолипидов в качестве инструментов используют фосфолипазы, химические модифицирующие реагенты и фосфолипидобменивающие белки. Целесообразность их применения в качестве молекулярных зондов зависит от объекта исследования и условий эксперимента. Однако во всех случаях должны быть удовлетворены следующие общие требования.

1. Исследуемые мембраны должны образовывать замкнутые непроницаемые везикулы, произошедшие из внутриклеточных мембранных органелл одного типа и имеющие одинаковую морфологическую ориентацию.

2. Применяемые зонды не должны проникать через мембрану и нарушать ее целостность.

3. В процессе эксперимента фосфолипиды в мембранах не должны перегруппировываться и подвергаться каким-либо структурным нарушениям.

5.1. Мембранные препараты

Мембраны эндоплазматического ретикулума гепатоцитов в форме везикул (микросом) можно выделить из печени крысы дифференциальным центрифугированием (гл. 1). По данным электронной микроскопии и цитохимического анализа все микросомные везикулы имеют одинаковую ориентацию: цитозольная сторона мембраны обращена наружу, а поверхность, направленная в просвет цистерн эндоплазматического ретикулума, — внутрь. К счастью для исследователей, все мембранные органеллы, выделяемые с помощью обычных методов гомогенизации и центрифугирования, имеют одинаковую ориентацию. Так, замкнутые органеллы, такие как лизосомы, пероксисомы и митохондрии, при выделении сохраняют ту морфологию, которую они имели в клетке. Мембраны аппарата Гольджи выделяются в виде цистерн или небольших везикул, обладающих такой же ориентацией, как и мембраны *in situ*. В некоторых случаях бывает полезно иметь везикулы или с нормальной, или с обратной ориентацией. Такие везикулы удается получить в случае мембран эритроцитов; для других же мембран методы получения чистых препаратов вывернутых непроницаемых везикул разработаны недостаточно.

5.2. Проницаемость микросомной мембраны

Проницаемость микросомной мембраны можно определить несколькими методами.

5.2.1. Высвобождение меченых белков из везикулярных цистерн

Шероховатый эндоплазматический ретикулум является местом синтеза секретируемых белков. Новосинтезированные белки высвобождаются в просвет цистерн. Секретируемые белки микросомных везикул, выделяемые из печени крысы, можно пометить путем внутрибрюшинной инъекции [^{14}C]- или [^3H]-лейцина (5 мкКи в 0,1 мл 0,14 М NaCl на 100 г живого веса) за 30 мин до умерщвления животного и извлечения печени [24].

1. После обработки микросом зондом осаждают мембраны центрифугированием (105 000 *g* в течение 30 мин), растворяют осадок и образец исходных (необработанных) микросом в растворе для солюбилизации тканей (например, в солуне

350 фирмы Packard Instruments или в растворе BTS 450 фирмы Beckman Instruments).

2. Добавляют сцинтиллятор в соответствии с рекомендациями фирмы-поставщика и определяют радиоактивность образцов.

3. Отбирают также пробы надосадочной жидкости, добавляют сцинтиллятор и определяют радиоактивность этих образцов.

$$\frac{\text{Доля меченых белков, высвободившихся из микросом, \%}}{\text{}} = \frac{\text{Расп./мин в супернатанте}}{\text{Расп./мин в супернатанте} + \text{+ расп./мин в мембранах}} \cdot 100.$$

Радиоактивность необработанных зондом мембран должна совпадать с суммарной радиоактивностью мембранного осадка и надосадочной жидкости. Следует провести также контрольные эксперименты, в которых микросомы инкубируют без зонда и выделяют центрифугированием. Если доля белка, высвободившегося из обработанных зондом мембран, выше, чем в случае необработанных мембран, это означает, что целостность мембран нарушается в присутствии зонда.

5.2.2. Латентность маннозо-6-фосфатазы

Глюкозо-6-фосфатаза, маркерный фермент эндоплазматического ретикулума печени, состоит из двух компонентов — трансферазы, которая осуществляет транспорт глюкозо-6-фосфата через микросомную мембрану, и гидролазы, локализованной на внутренней поверхности мембранных везикул. Трансфераза обладает высокой специфичностью и не транспортирует маннозо-6-фосфат, тогда как гидролаза имеет низкую специфичность и может гидролизовать маннозо-6-фосфат [25]. Таким образом, маннозо-6-фосфатазная активность является латентной и проявляется только в проницаемых микросомных везикулах. Эта латентность устраняется при обработке микросом детергентами, например таурохолатом.

Определение активности маннозо-6-фосфатазы

Реагенты

а. Буфер 0,05 М трис-HCl, pH 7,4, содержащий сахарозу в концентрации 0,25 М.

б. 4%-ный таурохолат в буфере а).

в. 10 мМ маннозо-6-фосфат в буфере а).

г. 10%-ная трихлоруксусная кислота.

д. Растворы для определения фосфата (см. выше).

Методика определения

1. После обработки микросом зондом отбирают пробы (0,1 мл, что соответствует не более 500 мкг белка) и вносят их в два комплекта пробирок, содержащих по 0,8 мл трис-буфера.

2. Добавляют по 0,1 мл таурохолата в пробирки одного комплекта и по 0,1 мл буфера в пробирки другого комплекта.

3. Помещают пробирки в водяную баню при 37°C и, когда они нагреются до этой температуры, добавляют по 0,1 мл раствора в) в каждую пробирку.

4. Останавливают реакцию через определенные промежутки времени в интервале 0—15 мин добавлением 0,1 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты и охлаждают пробирки во льду.

5. Осаждают белок в настольной центрифуге и отбирают по 0,5 мл надосадочной жидкости.

6. Добавляют по 0,5 мл 2,5%-ного молибдата аммония и по 0,2 мл раствора аминафтаолсульфокислоты, перемешивая после каждого добавления, как описано в разд. 4.2, но опуская этап сжигания.

7. Прикрывают пробирки стеклянными шариками и прогревают их в кипящей водяной бане в течение 9 мин. Охлаждают пробирки и измеряют оптическую плотность при 830 нм. Определяют количество образовавшегося фосфата (в мкмольях) по калибровочной кривой, построенной так, как описано ранее.

8. Активность маннозо-6-фосфатазы зависит от времени и от концентрации белка. По линейному участку временной зависимости определяют число мкмольей фосфата, образующегося за 1 мин.

Латентность маннозо-6-фосфатазы равна

$$\frac{\text{Активность в присутствии таурохолата} - \text{Активность без таурохолата}}{\text{Активность в присутствии таурохолата}} \cdot 100(\%)$$

Доля интактных микросомных везикул превышает 90%. Она должна сохраняться в процессе обработки мембран зондами, действующими на фосфолипиды.

5.2.3. Латентность этанолацилтрансферазы

Этанолацилтрансфераза катализирует перенос пальмитата от пальмитойл-СоА к этанолу. В микросомных везикулах этот фермент является латентным и более широко распространен в тканях, чем глюкозо-6-фосфатаза, которая обнаружена в больших количествах только в эндоплазматическом ретикулуме печени [26]. Поэтому этанолацилтрансфераза расширяет возможности контроля за целостностью микросомных мембран и ее можно использовать в случае микросом, не содержащих маннозо-6-фосфатазы.

*Определение активности этанолацилтрансферазы**Реагенты*

а. Буфер 0,175 М трис- HCl , pH 7,0, содержащий 1 мг/мл альбумина и 8 мМ MgCl_2 .

б. 400 мкМ $[\text{}^{14}\text{C}]$ - или $[\text{}^3\text{H}]$ -пальмитоил- CoA (100 мкКи/мкмоль) в буфере а).

в. Абсолютный этанол.

г. 1%-ный дезоксихолат в буфере а).

Методика определения

1. Готовят комплект пробирок, содержащих по 0,14 мл буфера а) и по 10 мкл абсолютного этанола. К половине пробирок добавляют по 20 мкл дезоксихолата, а к другой половине — по 20 мкл буфера а).

2. После обработки микросом зондом отбирают пробы, содержащие примерно по 2 мкг белка в 10 мкл, и переносят их в пробирки.

3. Начинают реакцию добавлением 20 мкл меченого пальмитоил- CoA . Через 2 мин останавливают ее добавлением 1,5 мл смеси изопропанол/гептан/вода (80 : 20 : 20, о/о). Оставляют реакционную смесь на 5 мин.

4. Добавляют 1,0 мл гептана и 0,5 мл воды и перемешивают. Дают разделиться двум фазам. Отбирают верхнюю фазу и промывают ее 0,05 М NaOH в 50%-ном этаноле для удаления пальмитиновой кислоты.

5. Отбирают пипеткой пробы из каждой гептановой фазы и вносят их во флаконы сцинтилляционного счетчика. Испаряют растворитель в потоке азота, добавляют сцинтиллятор и определяют радиоактивность образцов.

Латентность этанолацилтрансферазы равна

$$\frac{\text{Расп./мин в гептановой фазе в присутствии дезоксихолата}}{\text{Расп./мин в гептановой фазе в отсутствие дезоксихолата}} \cdot 100 (\%)$$

Расп./мин в гептановой фазе в присутствии дезоксихолата

Как и в случае маннозо-6-фосфатазы, латентность этанолацилтрансферазы в непроницаемых микросомных везикулах превышает 90%.

5.2.4. Проницаемость других мембранных везикул

Используя подходы, подобные описанным выше, можно проконтролировать целостность мембранных везикул, приготовленных из различных клеточных органелл.

Высвобождение в инкубационную среду лактатдегидрогеназы, растворимого цитозольного фермента, свидетельствует о нарушении целостности выделенных клеток. Аналогично можно использовать гемоглобин для контроля за проницаемостью

мембраны эритроцитов. Определяя количество лактатдегидрогеназы, захваченной везикулами при гомогенизации плазматических мембран, можно судить о проницаемости полученных мембранных препаратов [27]. Препараты мембран Гольджи содержат секретируемые белки, которые можно пометить, как это описано для микросомных мембран, и затем с их помощью контролировать целостность мембран [28]. В мембранах Гольджи содержится также галактозилтрансфераза; с ее помощью тоже удастся контролировать состояние везикул точно так же, как с помощью маннозо-6-фосфатазы в случае микросом [28].

5.3. Сохранение структурной организации микросомных мембран

Сохраняется ли структура фосфолипидного бислоя при экспериментальных процедурах, используемых для установления топологической асимметрии мембран? Ответить на этот вопрос очень трудно. Конечно, с помощью электронной микроскопии срезов и сколов мембранных препаратов до и после обработки зондом можно установить, сохраняет ли мембранный бислой свою прежнюю организацию или в нем происходят сколько-нибудь значительные структурные изменения. Однако этот метод не позволяет обнаружить трансмембранную миграцию фосфолипидных молекул. Лучшее всего было бы исследовать с помощью одного и того же зонда как нормальные, так и вывернутые везикулы. Если при этом получатся согласующиеся между собой результаты, значит, структура мембраны не изменяется при действии зонда. Однако, как мы уже отмечали, препараты вывернутых непроницаемых везикул удастся надежно получать только из мембран эритроцитов.

В качестве компромиссного решения можно рекомендовать проводить исследования трансмембранного распределения липидов с применением более чем одного зонда, поскольку маловероятно, что различные воздействия, оказываемые ими на липиды, будут вызывать одинаковые структурные перестройки в мембране. В ходе контрольных экспериментов необходимо также убедиться, что результаты, полученные на замкнутых везикулах, нельзя объяснить специфичностью использованного зонда. Для этого мембранные везикулы следует сделать проницаемыми и, обработав их зондом, показать, что в этих условиях фосфолипиды становятся полностью доступными.

5.3.1. Методы приготовления незамкнутых микросомных везикул

Микросомную мембрану можно сделать проницаемой несколькими способами. Об их эффективности судят по высвобождению

дению содержимого везикул или по степени латентности маннозо-6-фосфатазы и этанолацилтрансферазы.

Обработка карбонатом натрия. Под действием этого агента нарушается целостность микросомных везикул и происходит слияние их мембран с образованием незамкнутых мембранных структур [29].

1. Ресуспандируют микросомы в концентрации менее 1 мг/мл (по белку) в 100 мМ карбонате натрия, pH 11,0. Оставляют суспензию на 30 мин во льду.

2. Осаждают микросомы центрифугированием при 105 000 g в течение 60 мин. Если необходимо полностью отделить мембраны от надосадочной жидкости, в которую переходит содержимое везикул, следует увеличить длительность центрифугирования до 120 мин, затем ресуспандировать осадок мембран в карбонате натрия и повторно центрифугировать суспензию для выделения мембран.

3. Промывают осадок соответствующим буфером для удаления раствора карбоната натрия перед ресуспандированием мембран для последующего исследования.

Продавливание через пресс Френча. Эта процедура приводит к фрагментации мембранных везикул и их разрушению [30].

1. Ресуспандируют микросомы в буфере, который предстоит использовать в последующих исследованиях, в концентрации по белку 5 мг/мл.

2. Вносят суспензию в патрон пресса Френча и повышают давление до 1500 атм.

3. Оставляют суспензию на 5 мин для уравнивания и *осторожно* открывают вентиль, так чтобы мембранная суспензия вытекала со скоростью около одной капли в секунду.

Суспензию, которая становится значительно прозрачнее после этой обработки, можно использовать сразу же, без предварительного осаждения мембран, поскольку ее концентрация является достаточной для проведения дальнейших исследований.

Обработка детергентом. Мембраны можно сделать проницаемыми и при добавлении детергентов к суспензии микросомных везикул. Для этого подходят таурохолат (0,4%), дезоксихолат (0,05%) и лизолецитин (0,005%). Обработанный детергентами препарат можно сразу же использовать для дальнейших исследований при условии, что зонд не теряет свою активность в присутствии детергента.

Таким образом, микросомные мембраны можно сделать проницаемыми в щелочной среде и при низком осмотическом давлении, механическом воздействии или действии детергентов. Эти методы пригодны в случае мембран аппарата Гольджи, а также, вероятно, и других субклеточных фракций.

6. Определение трансмембранного распределения фосфолипидов с помощью гидролитических ферментов

6.1. Общие принципы

Мембранные везикулы инкубируют в присутствии фосфолипазы и без нее в условиях, при которых не нарушается целостность мембраны. Липиды экстрагируют, отделяют фосфолипиды и определяют степень их гидролиза, сравнивая обработанные и необработанные фосфолипазой мембраны.

6.2. Фосфолипазы

Фосфолипазы гидролизуют фосфолипиды по различным связям (рис. 4.7). Фосфолипазы A_1 и A_2 отщепляют ацильные группы по положениям 1 и 2 глицеринового остатка, в результате чего образуются соответствующие лизофосфолипиды. Фосфолипаза C отщепляет фосфорильный остаток, давая диацилглицеролы, а фосфолипаза D отщепляет этерифицирующую фосфат спиртовую группу с образованием фосфатидной кислоты.

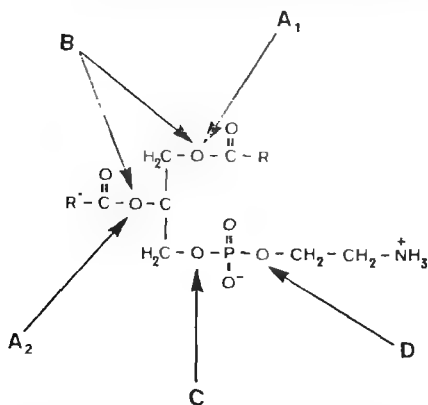


Рис. 4.7. Связи, по которым осуществляется гидролиз фосфолипидов под действием фосфолипаз.

В принципе все эти ферменты можно использовать как зонды. Чтобы определить их пригодность в каждом конкретном случае, необходимо показать, что они не нарушают целостность исследуемых мембран. Для микросомных мембран было показано, что фосфолипазу C из *Clostridium per-*

fringens и фосфолипазу D можно с успехом использовать в качестве зондов, тогда как фосфолипаза C из *Bacillus cereus* и фосфолипаза A из змеиного или пчелиного яда нарушают целостность мембран.

Фосфолипазы поставляются различными фирмами (Sigma, Boehringer, Worthington); рекомендуется использовать наиболее чистые препараты из тех, что имеются в продаже. Обзор по фосфолипазам и методам их очистки дан в работе [31].

6.3. Методика

1. Ресуспенсируют мембранные везикулы в концентрации 5 мг/мл (по белку) в буфере, который не нарушает их целостности. Для микросомных мембран используют 0,14 М NaCl,

pH которого доведен до 7,4 с помощью 0,05 М трис-HCl, 0,05 М фосфатного буфера или бикарбоната.

2. Для активации фосфолипазы С необходимы ионы кальция. Их конечная концентрация должна быть не ниже 0,25 мМ. Если же мембраны были выделены или инкубированы в присутствии хелатирующего агента, концентрацию ионов кальция следует повысить до 1 мМ.

3. К половине образцов добавляют фосфолипазу, так чтобы ее концентрация лежала в интервале, указанном ниже:

а) фосфолипаза С — от 1 до 10 ед/мл;

б) фосфолипаза А — от 0,5 до 5 ед/мл;

в) фосфолипаза D — от 1 до 10 ед/мл.

Скорость гидролиза зависит от концентрации фосфолипазы. При изучении процессов, протекающих с быстрым установлением равновесия (например, в экспериментах с радиоактивной меткой), фосфолипазу следует брать в высокой концентрации, сократив время инкубации. Объем инкубационной смеси может быть разным в зависимости от количества имеющегося мембранного белка. При исследовании микросом печени крысы обычно берут 5 мг белка в 1,0 мл, тогда как при исследовании мембран аппарата Гольджи приходится использовать 0,5 мг мембранного белка в объеме 0,1 мл.

4. Инкубируют мембраны в присутствии фосфолипазы и без нее. Останавливают реакцию добавлением смеси хлороформ/метанол (2:1) вместе с ЭДТА (10 мМ), которая хелатирует ионы кальция и предотвращает дальнейшее действие фосфолипазы С в ходе экстракции.

5. Экстрагируют липиды, как описано ранее, и определяют общее содержание липидного фосфора в пробах липидного экстракта. Если в качестве зонда использовалась фосфолипаза С, то степень гидролиза рассчитывают по формуле

$$100 - \frac{\text{Липидный фосфор в мембранах, обработанных фосфолипазой}}{\text{Липидный фосфор в мембранах, инкубированных без фосфолипазы}} \cdot 100.$$

Степень гидролиза индивидуальных липидов определяют после разделения основных классов фосфолипидов с помощью ТСХ. Для этого соскабливают силикагель, содержащий фосфолипиды, и определяют степень гидролиза каждого липида, как и в случае общего гидролиза.

Если в качестве зонда используют фосфолипазу А, то количество общего липидного фосфора остается прежним, поскольку продуктами гидролиза являются лизофосфолипиды. Для определения степени гидролиза под действием фосфолипазы А необходимо разделить фосфолипиды с помощью двумерной ТСХ. Можно также использовать одномерную хроматографию для

разделения основных классов фосфолипидов и определить степень их гидролиза путем сравнения с контрольными образцами, проинкубированными без фосфолипазы А.

С помощью предварительных экспериментов следует определить временной ход процесса гидролиза суммарных мембранных фосфолипидов. Эта зависимость должна выходить на плато при степени гидролиза около 50%, но конкретная цифра может зависеть от используемой фосфолипазы, поскольку не все фосфолипиды, содержащиеся в мембране, являются для нее субстратами. Кроме того, фосфолипиды могут располагаться в мембранном бислое асимметрично. Гидролиз фосфолипидов в микросомах выходит на плато при 50% через 5 мин при концентрации фосфолипазы С 10 ед./мл и через 15 мин при концентрации 1 ед./мл.

По данным, полученным в ходе этих экспериментов, можно рассчитать степень расщепления каждого мембранного фосфолипида при выходе гидролиза на плато; это отвечает содержанию данного фосфолипида на наружной поверхности бислоя.

Чтобы показать, что полученные результаты не обусловлены субстратной специфичностью использованной фосфолипазы, мембранные везикулы следует сделать проницаемыми с помощью одного из описанных выше методов и затем проинкубировать с фосфолипазой. Если тот или иной фосфолипид действительно расположен на наружной стороне мембраны, он должен полностью гидролизоваться в незамкнутых везикулах. Если же фосфолипид не гидролизуеться ни в случае открытых, ни в случае замкнутых везикул, то сказать о его топологической локализации ничего нельзя, и для определения его трансмембранного распределения следует использовать другие зонды.

7. Выяснение трансмембранного распределения фосфолипидов с помощью химических модифицирующих реагентов

7.1. Принцип метода

Мембранные везикулы инкубируют с химическим модифицирующим реагентом и определяют долю фосфолипида, вступившего в реакцию. Выбор химических реагентов для фосфолипидов не так богат, как для белков (см. гл. 6); они применяются главным образом для модификации аминокислот — фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина. Список реагентов, которые использовались с этой целью, включает метилфосфат формилметионина, динитрофторбензол и тринитробензол-сульфокислоту (ТНБС). Применение любого из этих реагентов оправдано только при условии соблюдения указанного выше требования: реагент не должен сам проникать через мембрану

и нарушать ее целостность. Ниже описана методика модификации микросом ТНБС. Этот реагент чаще других использовался для определения топологического распределения аминокислот в плазматических мембранах целых клеток, а также в ряде субклеточных мембранных препаратов.

7.2. Методика

1. Ресуспенсируют микросомы (1—12 мг по белку) в 5 мл 280 мМ маннитольного буфера (рН 7,4), содержащего 70 мМ сахарозу, 40 мМ бикарбонат натрия, 1 мМ $MgCl_2$ и 2 мМ сукцинат. рН буфера имеет большое значение, поскольку при $pH > 8,5$ микросомные везикулы становятся проницаемыми, и ТНБС попадает внутрь них.

2. Добавляют ТНБС до конечной концентрации 3,0 мМ. В диапазоне концентраций ТНБС от 1 до 12 мМ при количестве мембранного белка 8 мг получаются одинаковые результаты.

3. Инкубируют смесь в течение разных промежутков времени при 7 °С, комнатной температуре и 37 °С. Скорость модификации мембранных фосфолипидов увеличивается с ростом температуры, но конечная степень модификации остается той же самой. В некоторых экспериментах (например, с целыми клетками) инкубацию необходимо проводить при низких температурах, чтобы предотвратить проникновение ТНБС внутрь клеток.

4. Останавливают реакцию добавлением 1 мл 30%-ной ТХУ. Осаждают денатурированные мембраны с помощью настольной центрифуги и ресуспенсируют осадок в 1 мл метанола. Добавляют 8 мл смеси хлороформ/метанол/концентрированная HCl (2:1:0,01, о/о). Оставляют экстракт на 30 мин и добавляют 2,0 мл 0,02 М KCl в 0,1 М HCl для разделения его на две фазы. Отбрасывают верхнюю фазу, а нижнюю промывают 2,0 мл 0,2 М KCl в 0,1 М HCl и упаривают в вакууме или в потоке азота. Разделяют фосфолипиды с помощью ТСХ в системе хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (60:50:1:4). Модифицированные фосфолипиды имеют желтую окраску и их можно помечать на пластинках перед обнаружением непрореагировавших аминокислот с помощью нингидрина. Значения R_f для липидов примерно равны: тринитрофенилфосфатидилэтаноламин 0,86; фосфатидилэтаноламин 0,65; тринитрофенилфосфатидилсерин 0,6; фосфатидилсерин 0,55.

Соскабливают пятна силикагеля, содержащие фосфолипид, и определяют липидный фосфор. Рассчитывают долю модифицированных фосфолипидов по формуле:

Липидный фосфор модифицированных фосфолипидов · 100.

Суммарный липидный фосфор модифицированных и немодифицированных фосфолипидов

Суммарное содержание фосфора в модифицированных и немодифицированных фосфолипидах данного вида должно быть равно содержанию фосфора в этих фосфолипидах в контрольных микросомах, проинкубированных без ТНБС. Доля фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина, вступивших в реакцию с ТНБС в замкнутых везикулах, отвечает относительному содержанию этих фосфолипидов на наружной стороне мембраны.

Следует провести также контрольные эксперименты с использованием незамкнутых микросомных везикул, в которых все аминокислоты должны прореагировать с ТНБС. В микросомах с ТНБС реагируют около 30% аминокислот, а в незамкнутых везикулах — более 90%.

8. Выяснение трансмембранного распределения фосфолипидов с помощью фосфолипидобменивающих белков

8.1. Принцип метода

Фосфолипидобменивающие, или липидпереносящие, белки (ЛПБ) ускоряют обмен фосфолипидными молекулами между мембранами, липопротеинами и липосомами. Эти белки выделены из нескольких тканей, включая печень, сердце и мозг. Механизм функционирования ЛПБ окончательно не установлен, однако имеются данные о том, что *in vivo* они обеспечивают перенос, а не обмен фосфолипидов между мембранами и поэтому могут играть важную роль в биогенезе и обновлении мембран в клетке. *In vitro* ЛПБ осуществляют обмен (молекула на молекулу) фосфолипидов, находящихся на наружной стороне мембран. *In vivo* эти белки, по-видимому, функционируют, не изменяя структуру мембран, поэтому они могут служить уникальным инструментом для выяснения трансмембранного распределения фосфолипидов.

Исследуемые мембраны, меченные радиоактивным фосфолипидом (донорные мембраны), инкубируют с избытком других мембран или каких-либо фосфолипидсодержащих структур (акцепторов) в присутствии ЛПБ. Затем эти мембраны разделяют и оценивают долю метки, перенесенной от донора к акцептору, а также удельную радиоактивность фосфолипидов. Используя эти оценки и зная содержание данного фосфолипидов в мембране, можно рассчитать, какая часть его доступна для обмена и, следовательно, находится на наружной стороне мембраны.

8.2. Белки, участвующие в обмене фосфолипидов

ЛПБ, специфичные для фосфатидилхолина и фосфатидилинозитола, и неспецифичный ЛПБ, который способен переносить

Таблица 4.2. Включение метки в микросомные фосфолипиды

Меченый фосфолипид	Изотоп и удельная радиоактивность, мКи/100 г ¹⁾	Время от момента инъекции до приготовления микросом, ч
Все фосфолипиды	[³² P]-фосфат натрия	500—1000
Глицерофосфолипиды	[¹⁴ C]- или [³ H]-глицерол	5—20
Фосфатидилхолин	[¹⁴ C]- или [³ H]-холин ²⁾	5—20
	[¹⁴ C]- или [³ H]-(метил) метионин	5—20
Фосфатидилэтаноламин	[¹⁴ C]- или [³ H]-этанол-амин ²⁾	5—20
Фосфатидилинозитол	[¹⁴ C]- или [³ H]-миоинозитол ³⁾	5—20

¹⁾ Внутривенная или внутривенная инъекция.

²⁾ Поскольку азотистые основания включаются вначале в фосфолипиды наружной стороны мембраны, необходимо какое-то время для равномерного распределения метки между наружной и внутренней сторонами мембраны.

³⁾ Миоинозитол подвержен бактериальной деградации, поэтому его растворы следует готовить на стерилизованной воде и отбирать их для инъекции в стерильных условиях.

фосфатидилэтаноламин, были выделены из цитозоля печени быка [32]. Выбор того или иного ЛПБ в качестве мембранного зонда зависит от используемой системы донор — акцептор.

8.3. Акцепторные мембраны

При исследовании мембранных липидов в качестве акцептора берут липосомы, приготовленные из чистых фосфолипидов, липопротеины плазмы крови и природные мембраны, например мембраны эритроцитов и митохондрий. Единственное ограничение при выборе акцепторной мембраны состоит в том, что ее нужно иметь в концентрации, достаточной для обеспечения 10-кратного избытка по отношению к фосфолипидам донорной мембраны, при этом донорные и акцепторные мембраны должны легко разделяться с количественным выходом.

8.4. Радиоактивное мечение донорной мембраны

Мембранные фосфолипиды метят путем внутривенной или внутривенной инъекции радиоактивно меченного предшественника, осуществляемой перед умерщвлением животного. Некоторые условия мечения микросом печени приведены в табл. 4.2. Аналогично можно пометить и другие мембраны. Степень включения в них предшественника определяют в ходе предварительных экспериментов, проведя экстракцию фосфолипидов и их

анализ. Ниже описана методика определения доступного фосфатидилхолина в микросомной мембране, использованной в дальнейшем в опытах по обмену фосфолипидами с липосомами. В принципе эта методика пригодна для других мембран и других фосфолипидов при условии, что проведены необходимые контрольные эксперименты.

8.5. Приготовление липосом

1. С помощью пипетки вносят раствор фосфатидилхолина в органическом растворителе, содержащий 2% фосфатидной кислоты, в толстостенную пробирку или флакон. Испаряют растворитель, вращая пробирку, чтобы дать возможность липиду распределиться в виде тонкой пленки по стенкам сосуда.

2. Добавляют раствор, содержащий 0,25 М сахарозу, 0,01 М трис-буфер, 0,001 М ЭДТА, pH 7,4, и обрабатывают смесь в течение 10 мин ультразвуком с помощью диспергатора M. S. E. при уровне мощности 5. Во время этой процедуры пробирка должна быть погружена в лед. Количество используемого фосфолипида и объем буфера зависят от условий эксперимента (см. ниже).

3. Обрабатывают смесь с помощью ультразвука, центрифугируют в течение 90 мин при 105 000 g, чтобы осадить недиспергированные липиды, и отбирают верхние три четверти надосадочной жидкости. Пробы супернатанта экстрагируют смесью хлороформ/метанол (2:1) и определяют содержание фосфолипидов, как описано выше.

4. Инкубируют радиоактивно меченные микросомы, содержащие 0,5—1,0 мг фосфатидилхолина (3—5 мг микросомного белка), с липосомами (5—10 мг фосфатидилхолина) в конечном объеме 1,0 мл среды, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,01 М трис-буфер и 0,001 М ЭДТА (pH 7,4), в присутствии ЛПБ и без него в течение различных интервалов времени при 25 °C. После инкубации осторожно насливают микросомную суспензию поверх 0,75 М раствора сахарозы (9,0 мл) в центрифужных пробирках и центрифугируют при 105 000 g в течение 90 мин. Микросомы осаждаются, а липосомы остаются в надосадочной жидкости.

5. Экстрагируют липиды как из липосом, так и из микросом, разделяют их с помощью ТСХ и элюируют фосфатидилхолин. Отбирают пробы для определения липидного фосфора и радиоактивности. Исходя из этих данных рассчитывают долю меченого фосфолипида, перенесенного из микросом в липосомы, и удельную радиоактивность фосфатидилхолина (в расп./мин на мкмоль липида).

Обмен фосфатидилхолина между липосомами и микросомами регистрируют по переносу метки из одной мембранной фрак-

ции в другую, а также по уменьшению удельной радиоактивности изучаемого липида в микросомах и увеличению ее в липосомах. В условиях, описанных выше, обмен обычно завершается в течение часа. Но в целом длительность инкубации зависит от активности препарата ЛПБ. При этом необходимо учесть, что микросомы не следует инкубировать более двух часов, поскольку целостность их мембраны при более длительной инкубации нарушается. Чтобы уменьшить время инкубации, следует увеличить концентрацию ЛПБ в инкубационной среде.

В равновесии, т. е. по завершении процесса обмена, и при условии, что в микросомах весь фосфатидилхолин доступен для обмена, а в липосомах — $\frac{2}{3}$ его (это соответствует доле фосфатидилхолина на наружной стороне липосом), выполняется соотношение

$$\text{Перенесенная метка (расп./мин)} = \frac{\text{ФХ-липо}}{\text{ФХ-липо} + \text{ФХ-микро}} \cdot \frac{\text{Общая метка}}{\text{(расп./мин)}},$$

где ФХ-липо — обменный фонд фосфатидилхолина в липосомах ($\frac{2}{3}$ его общего содержания), ФХ-микро — суммарный микросомный фосфатидилхолин, общая метка — исходная радиоактивность препарата микросом.

Если количество перенесенной метки меньше, чем ожидается при исчерпывающем обмене, это означает, что доступен не весь микросомный фосфатидилхолин и, следовательно, часть его находится на внутренней стороне мембраны. Долю его можно рассчитать по формуле

$$\frac{\text{Перенесенная метка (расп./мин)}}{\text{метка}} = \frac{\text{ФХ-липо}}{\text{ФХ-липо} + \text{ФХ}_{\text{нар-микро}}} \cdot \frac{\text{ФХ}_{\text{нар-микро}}}{\text{ФХ-микро}} \cdot \frac{\text{Общая метка}}{\text{(расп./мин)}},$$

где ФХ_{нар-микро} — количество фосфатидилхолина в наружном слое мембраны микросом.

Удельная радиоактивность липосомного фосфатидилхолина составляет $\frac{2}{3}$ от удельной радиоактивности фосфатидилхолина в наружном слое мембраны микросом при равновесии, а удельная радиоактивность фосфатидилхолина во внутреннем слое остается такой же, как и в исходных микросомах. Экспериментально измеренная удельная радиоактивность должна согласовываться с расчетной величиной, полученной из доли фосфатидилхолина в наружном слое микросомной мембраны.

Эксперименты, проведенные с ЛПБ, показали, что весь фосфатидилхолин в микросомах печени крысы доступен для обмена. По-видимому, это связано с трансмембранным переносом фосфатидилхолина, что делает метод ЛПБ непригодным в случае микросом. С другой стороны, ЛПБ с успехом использовались для изучения мембраны эритроцитов и в принципе могут

применяться при изучении других мембран с помощью методик, подобных описанным в этом разделе.

При исследовании трансмембранного распределения фосфолипидов необходимо показать, что мембранные везикулы остаются замкнутыми в ходе эксперимента. Важно также убедиться, что донорные и акцепторные мембраны можно разделить после проведения обмена. Липосомы имеют тенденцию прилипать к мембранным везикулам. Чтобы удостовериться в том, что этого не происходит, проводят контрольный эксперимент, при котором оба типа мембран метят необменивающимися маркерами. Подходящим маркером для липосом является [^{14}C]-холестерололеат, а микросомы и другие клеточные мембраны метят [^3H]-лейцином, вводя его животным либо незадолго до умерщвления (за 30 мин), чтобы пометить секретируемые белки, либо значительно раньше (за 24 ч), чтобы пометить мембранные белки. С помощью этих меток можно определить степень взаимного загрязнения липосом и мембран в ходе эксперимента.

5. Изучение биосинтеза, круговорота и внутриклеточного транспорта мембранных фосфолипидов

В предыдущих разделах описаны экспериментальные методы, которые можно применить также для исследований биосинтеза мембранных липидов и их внутриклеточного транспорта. Для этого радиоактивно меченные предшественники мембранных фосфолипидов включают *in vivo* или *in vitro* в импульсном режиме или в импульсном эксперименте с вытеснением метки. Затем определяют кинетику появления новосинтезированных фосфолипидов в апикальной области клетки либо на поверхности мембраны, обращенной внутрь цистерн или в цитоплазму.

9.1. Включение меченых предшественников в фосфолипиды

В условиях *in vivo* меченые предшественники включаются в мембранные липиды так, как это описано в табл. 4.2. В экспериментах с вытеснением метки для разбавления радиоактивного предшественника проводят повторную инъекцию немеченого предшественника. Это особенно важно, если меченый предшественник образует медленно метаболизирующийся пул в исследуемых клетках.

В экспериментах *in vitro* метка включается главным образом в эндоплазматический ретикулум (выделяемый как фракция микросом; гл. 1), который является основным местом синтеза мембранных липидов в гепатоцитах; впрочем, недавние исследования показали, что биосинтез фосфолипидов осуществляется

в какой-то мере и в других мембранных органеллах. Ясно, что радиоактивные предшественники фосфолипидов можно включить *in vitro* в те мембраны, которые содержат соответствующую ферментативную активность.

9.1.1. Включение цитидиндифосфохолина и цитидиндифосфоэтаноламина в фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин

Инкубируют мембраны (до 11 мг по белку) с цитидиндифосфо[^{14}C]-холином или цитидиндифосфо[^{14}C]-этаноламином (0,8 М, удельная радиоактивность $\sim 10^6$ расп./мин на мкмоль) в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,87%-ный NaCl, 1 мМ ЭГТА и 15 мМ MgCl_2 .

9.1.2. Включение метильных групп из S-аденозилметионина в фосфатидилхолин

Метильные группы переносятся от S-аденозил[^{14}C]-метионина на фосфатидилэтаноламин. Катализируются ли все три стадии метилирования одним или двумя ферментами, пока неясно. Чтобы осуществить синтез фосфатидилхолина по этому пути в оптимальных условиях, следует проинкубировать мембраны (до 5 мг по белку) с 1 мМ S-аденозил[^{14}C]-метилметионином (удельная радиоактивность 10^6 расп./мин на 1 мкмоль) в 50 мМ трис-HCl, pH 8,5, содержащем 0,87%-ный NaCl и 10 мМ MgCl_2 .

9.1.3. Включение азотистых оснований в фосфолипиды в ходе реакции обмена

Мембраны эндоплазматического ретикулума содержат ферменты, которые катализируют обмен основаниями, находящимися в составе фосфолипидных молекул и содержащимися в инкубационной среде. Роль этих ферментов *in vivo* пока не выяснена. Эту реакцию можно использовать, чтобы пометить мембранные фосфолипиды с целью последующего изучения их миграции в бислое.

1. Инкубируют микросомы (2—3 мг по белку) с 0,75 мМ [^{14}C]-основанием (этаноламин, холин, серин) с удельной радиоактивностью около 10^6 расп./мин на мкмоль и 1,0 мМ CaCl_2 в NEPES-буфере (pH 7,4), содержащем 0,25 М сахарозу.

2. После включения меченых предшественников в мембраны реакцию можно остановить добавлением избытка немеченого предшественника к инкубационной среде или выделением мембраны с помощью центрифугирования.

9.2. Определение локализации новосинтезированных фосфолипидов

После мечения фосфолипидов в условиях *in vivo* субклеточные органеллы, подлежащие исследованию, приходится выделять (гл. 1). Мембраны, меченные *in vitro*, исследуют без дополнительной очистки.

Для анализа включения предшественников мембранные липиды экстрагируют, разделяют их с помощью ТСХ, элюируют отдельные фосфолипидные фракции и определяют их удельную радиоактивность. Так можно определить скорость включения предшественников в различные фосфолипиды.

Относительное содержание меченого фосфолипида на наружной стороне мембраны и удельную радиоактивность наружного и внутреннего пула того или иного фосфолипида можно определить с помощью фосфолипаз, химических модифицирующих реагентов или фосфолипидпереносящих белков (см. выше). Как и при исследовании трансмембранного распределения фосфолипидов, необходимо проводить контрольные эксперименты на незамкнутых мембранных везикулах. Новосинтезированные, т. е. меченые, фосфолипиды, недоступные для зонда в замкнутых везикулах, должны стать доступными после нарушения их целостности.

Фосфолипиды накапливаются внутри субклеточных частиц (особенно в мембранах Гольджи) и в меньшей степени в эндоплазматическом ретикулуме. Чтобы определить степень захвата меченых липидов, мембранные везикулы следует сделать проницаемыми с помощью карбоната натрия или продавливания через пресс Френча (см. выше). Мембранные фракции выделяют длительным центрифугированием (например, 2 ч при 105 000 *g*) с повторным центрифугированием супернатанта (1 ч при 105 000 *g*), чтобы произошло полное отделение мембран от содержимого везикул. Из надосадочной жидкости липиды экстрагируют по методу Блая — Дайера [4], а из мембран — с помощью смеси хлороформ/метанол (2:1). Эта методика позволяет определить содержание меченых фосфолипидов в субклеточных органеллах на обеих сторонах их мембраны и в секретируемом материале. Таким способом можно изучать взаимные превращения мембранных фосфолипидов и возможные пути трансформации предшественника в продукт в различных мембранах и тканях.

Литература

1. Berridge M. J., Irvine R. F. (1984). *Nature*, **312**, 315.
2. Hirata F. (1985). In: *Phospholipids of the Nervous System*. Horrocks J. A., Kanfer J. N., Porcellatti G. (eds.), Raven Press, New York, Vol. II, p. 99.

3. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. (1957). *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
4. Bligh E. G., Dyer W. J. (1959). *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911.
5. Kates M. (1972). *Techniques of Lipidology*. Elsevier, North-Holland.
6. Christie W. W. (1982). *Lipid Analysis*. Second Edition, Pergamon Press.
7. Marinetti G. V. (1976). *Lipid Chromatographic Analysis*, Marcel Dekker.
8. Skipski V. P., Barclay M., Reichman E. S., Good J. J. (1967). *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 80.
9. Gonzalez-Sastre F., Folch-Pi J. (1968). *J. Lipid Res.*, **9**, 532.
10. Tolbert M. E. H., White A. C., Aspry K., Cutts J., Fain J. N. (1980). *J. Biol. Chem.*, **255**, 1938.
11. Grado C., Ballou C. E. (1961). *J. Biol. Chem.*, **236**, 54.
12. Tomlinson R. V., Ballou C. E. (1961). *J. Biol. Chem.*, **236**, 54.
13. Ellis R. B., Galliard T., Hawthorne J. N. (1963). *Biochem. J.*, **88**, 125.
14. Downes C. P., Michell R. H. (1981). *Biochem. J.*, **198**, 133.
15. Irvine R. F., Brown K. D., Berridge M. J. (1984). *Biochem. J.*, **221**, 269.
16. Vaskovsky V. E., Kostevsky E. Y. (1968). *J. Lipid Res.*, **9**, 396.
17. Fiske C. H., Subbarow Y. (1925). *J. Biol. Chem.*, **66**, 325.
18. Bartlett G. R. (1959). *J. Biol. Chem.*, **234**, 466.
19. Snyder F., Stephens N. (1959). *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 244.
20. Duncombe W. G. (1965). *Biochem. J.*, **88**, 7.
21. Etamadi A.-H. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 423.
22. Op den Kamp J. A. F. (1979). *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 47.
23. Van Deenen L. L. M. (1981). *FEBS Lett.*, **123**, 3.
24. Kreibich G., Debey P., Sabatini D. D. (1973). *J. Cell Biol.*, **58**, 436.
25. Arion W. J., Ballas L. M., Lange A. J., Wallin B. K. (1976). *J. Biol. Chem.*, **251**, 4901.
26. Polakoff M., Bell R. M. (1978). *J. Biol. Chem.*, **253**, 7173.
27. Higgins J. A., Evans W. H. (1978). *Biochem. J.*, **174**, 563.
28. Higgins J. A. (1984). *Biochem. J.*, **219**, 261.
29. Fujiki Y., Hubbard A. L., Fowler S., Lazarow P. B. (1982). *J. Cell Biol.*, **93**, 97.
30. Higgins J. A., Hutson J. L. (1984). *J. Lipid Res.*, **25**, 1295.
31. van den Bosch H. (1982). In: *Phospholipids*. Hawthorne J. N., Ansell G. B. (eds.), Elsevier Biomedical, Amsterdam/New York/London, p. 313.
32. Westerman J., Kamp H. H., Wirtz K. W. H. (1983). *Methods Enzymol.*, **98**, 581.

СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ И РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

*Оуен Т. Джонс, Юли П. Эрнест,
Марк Дж. Мак-Нэми*

1. Введение

Очистка и характеристика мембранных белков ставят перед исследователем целый ряд специфических проблем, с которыми он обычно не сталкивается, работая с растворимыми белками. Мембранные белки, как правило, прочно связаны с липидным бислоем и фактически нерастворимы в воде. Поэтому для их солюбилизации и очистки приходится применять детергенты или другие разрушающие мембрану вещества. В соответствии с жидкомозаичной моделью структуры мембран [1] такие белки называют интегральными. Именно о них прежде всего и пойдет речь в этой главе.

Поскольку выделение интегральных белков обычно сопряжено с разрушением мембраны, во многих случаях необходимо убедиться, что в процессе выделения и очистки белка его функциональная активность не оказалась нарушенной или утраченной. Для этого, в частности, можно попытаться провести реконструкцию, т. е. встроить очищенный белок обратно в мембрану. Функциональную активность некоторых мембранных белков, таких, как ионные каналы или транспортные белки, можно охарактеризовать и измерить только в реконструированных мембранных системах. Для других мембранных белков, выполняющих функции ферментов или рецепторов, полезную информацию часто можно получить, используя солюбилизованные препараты.

Методы солюбилизации и реконструкции не только дают ценную информацию о функциях мембранных белков; их можно также использовать для того, чтобы перевести эти белки в состояние, удобное для проведения детального структурного анализа. Несомненно, детергенты будут играть ключевую роль в совершенствовании методов кристаллизации мембранных белков для последующего рентгеноструктурного анализа [2].

Конечно, необходимость проведения солюбилизации и реконструкции создает определенные сложности при исследовании мембранных белков. Но, с другой стороны, мембранным системам присущ ряд особенностей, благодаря которым задача ха-

рактеристики белков, осуществляющих тот или иной сложный биологический процесс, в значительной мере облегчается. В настоящее время разработаны эффективные методы разделения различных мембран по размеру, плотности, поверхностному заряду и другим физическим параметрам (гл. 1). С их помощью удастся обогатить мембранную фракцию с необходимой функциональной активностью в 10—100 раз, не нарушая целостность мембраны. Имеющиеся сейчас методы гомогенизации тканей, разрушения клеток и фракционирования мембран позволяют сравнительно легко определять субклеточную локализацию функционально важных мембранных структур. В некоторых случаях (например, для высших растений) именно трудности очистки и функциональной характеристики различных мембран были главным препятствием на пути выделения мембранных белков, но сегодня и здесь уже достигнуты определенные успехи [3, 4] (гл. 1 и 2).

В этой главе мы опишем некоторые экспериментальные подходы, оказавшиеся полезными при солюбилизации, очистке и реконструкции мембранных белков. К сожалению, сейчас не существует какого-либо одного детергента или единого метода реконструкции, который оказался бы применимым ко всем без исключения мембранным белкам. В этом отношении исследование мембранных белков пока остается скорее искусством, чем наукой. Мы постараемся дать необходимые сведения о наиболее широко используемых детергентах и предложить практические рекомендации по их применению. В тех случаях, когда это возможно, будут изложены общие принципы работы с детергентами и обсуждены границы применимости лежащих в их основе теоретических представлений.

В данной главе рассмотрены также критерии, по которым можно судить об успешности реконструкции. При разработке метода определения активности реконструированного белка следует принимать во внимание такие аспекты, как гомогенность мембранного препарата, размер частиц, характер распределения и ориентации белковых молекул в мембране, целостность мембраны и т. д. Не вызывает сомнения, что все эти важные параметры зависят (иногда непредсказуемым образом) от природы детергентов и липидов, а также от методов, используемых для солюбилизации и реконструкции.

В главе широко представлены примеры, касающиеся различных мембранных систем. Но собственный опыт авторов накоплен прежде всего в ходе работы с никотиновым ацетилхолиновым рецептором из электрических органов ската *Torpedo californica*. Это один из наиболее охарактеризованных мембранных белков, и с точки зрения реконструкции мы будем рассматривать его как модельный объект. В последние годы было опубли-

ковано несколько работ, в которых сделана попытка пролить свет на довольно запутанную и противоречивую проблему использования детергентов в реконструкции мембран [4, 5]. В тех случаях, когда какие-либо теоретические и практические вопросы реконструкции не находят достаточного отражения в данной главе, мы даем ссылки на другие источники информации.

2. Солюбилизация мембранных белков

Как указано в разд. 1, первый этап очистки того или иного мембранного белка обычно включает выбор подходящего биологического источника и выделение мембранной фракции, обогащенной данным белком. На следующем этапе проводят солюбилизацию детергентами, и поэтому целью данного раздела является теоретическое и практическое рассмотрение проблемы солюбилизации интегральных мембранных белков.

С физико-химической точки зрения солюбилизация представляет собой «процесс получения термодинамически устойчивого изотропного раствора вещества, обычно нерастворимого в данном растворителе, путем введения добавок амфифильного компонента или компонентов» [6]. Такое определение применимо и в отношении солюбилизации и реконструкции биологических мембран, которые состоят из липидов и белков, нерастворимых в воде. Подходящими амфифилами в данном случае являются детергенты. При добавлении к биологической мембране детергент обычно включается в нее до достижения точки насыщения, после чего мембрана начинает распадаться на смешанные мицеллы детергент — липид — белок (см. рис. 5.1, а также работы [7, 8]).

2.1. Критерии солюбилизации

Чаще всего о солюбилизации судят по появлению белка или соответствующей биологической активности в надосадочной жидкости после высокоскоростного центрифугирования, обычно при 105 000 *g* в течение 1 ч [4]. Большинство мембран в этих условиях осаждаются, и таким образом можно отделить солюбилизированный материал от несолюбилизированного. Однако следует помнить, что такой критерий солюбилизации не является строгим, поскольку полнота осаждения может зависеть от многих факторов, например от температуры и плотности среды и, в частности, от присутствия таких добавок, как сахароза и глицерол.

Существуют и другие критерии солюбилизации. Гель-фильтрация на носителях с крупным размером пор дает возможность отделить нерастворимый (или агрегированный) материал, вы-

ходящий в свободном объеме колонки, от солюбилизованного, который задерживается в геле [4, 9]. Но и в этом случае различие между растворимой и нерастворимой фракциями остается нечетким и будет зависеть от способности данного геля фракционировать частицы по размеру.

В принципе можно было бы легко отличить солюбилизованный материал от несолюбилизованного с помощью электронной микроскопии. Однако обычные методы подготовки препарата для микроскопирования могут привести к разбавлению детергента и в результате к частичной реконструкции мембран [10].

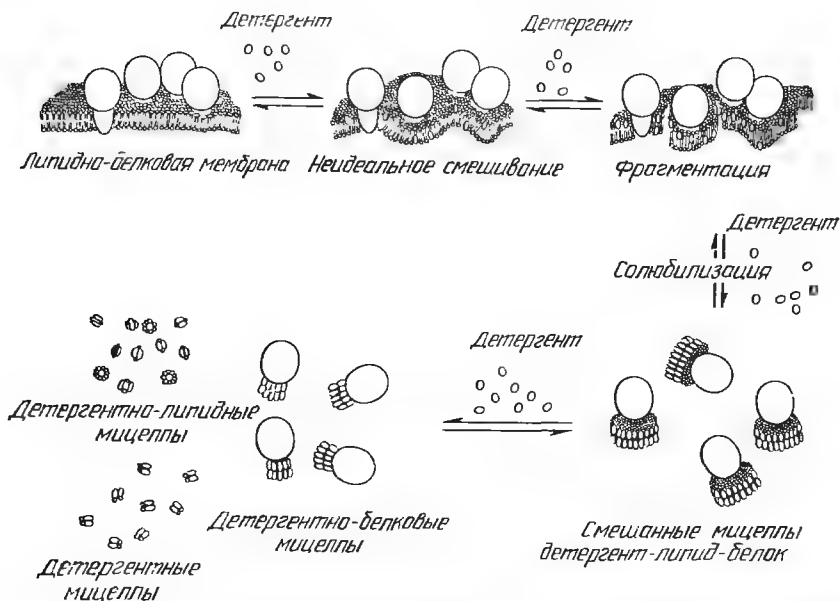


Рис. 5.1. Схема взаимодействия детергентов с биологическими мембранами.

При солюбилизации мутность раствора обычно значительно уменьшается, что можно зарегистрировать по уменьшению светорассеяния образца либо по увеличению его светопропускания. Однако даже при полной солюбилизации белков раствор может не быть оптически прозрачным из-за присутствия крупных мицелл, которые содержат как белки, так и липиды.

Очень перспективным для контроля за полнотой солюбилизации с помощью детергентов является, по-видимому, метод ^{31}P -ЯМР [11, 12]. О ходе солюбилизации можно судить по превращению широкого ЯМР-сигнала, характерного для фосфолипидов в составе мембран, в узкий пик, который дают фосфоли-

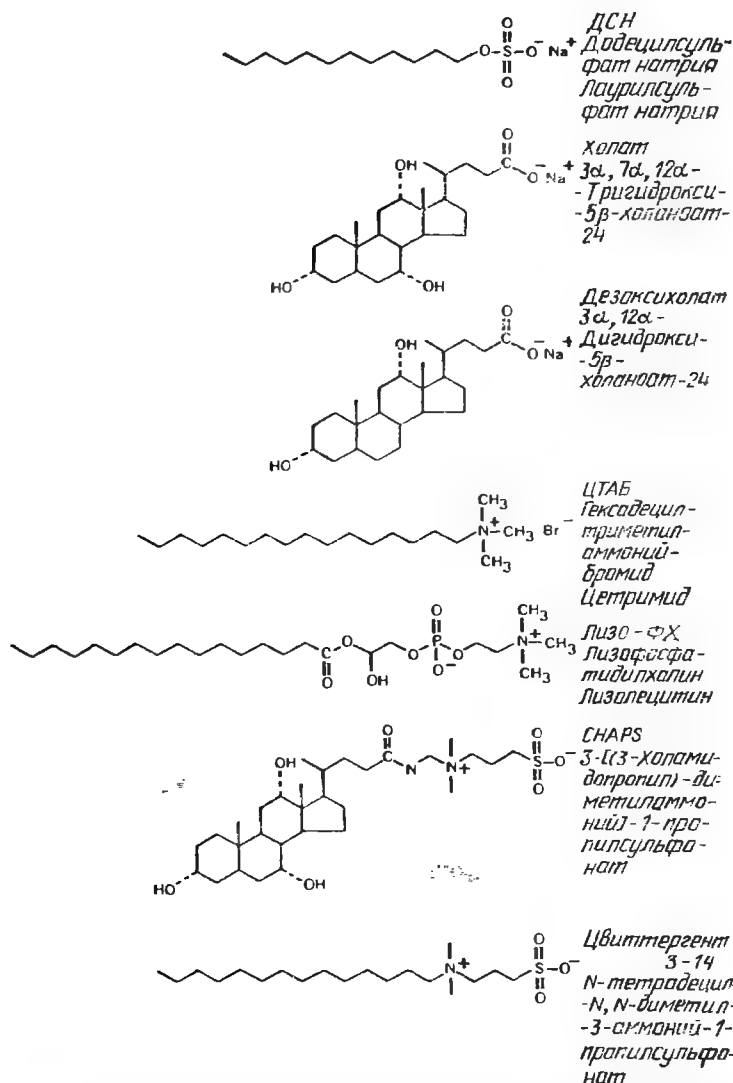


Рис. 5.2. Структурные формулы и названия широко используемых детергентов. пида в мицеллах. К сожалению, ЯМР-спектрометры имеются далеко не во всех лабораториях.

При солюбилизации детергентами возникает вопрос о возможности избирательного извлечения из мембраны именно тех компонентов, которые интересуют исследователя. Известно, например, что с помощью неионного детергента C₁₂E₈ (см.

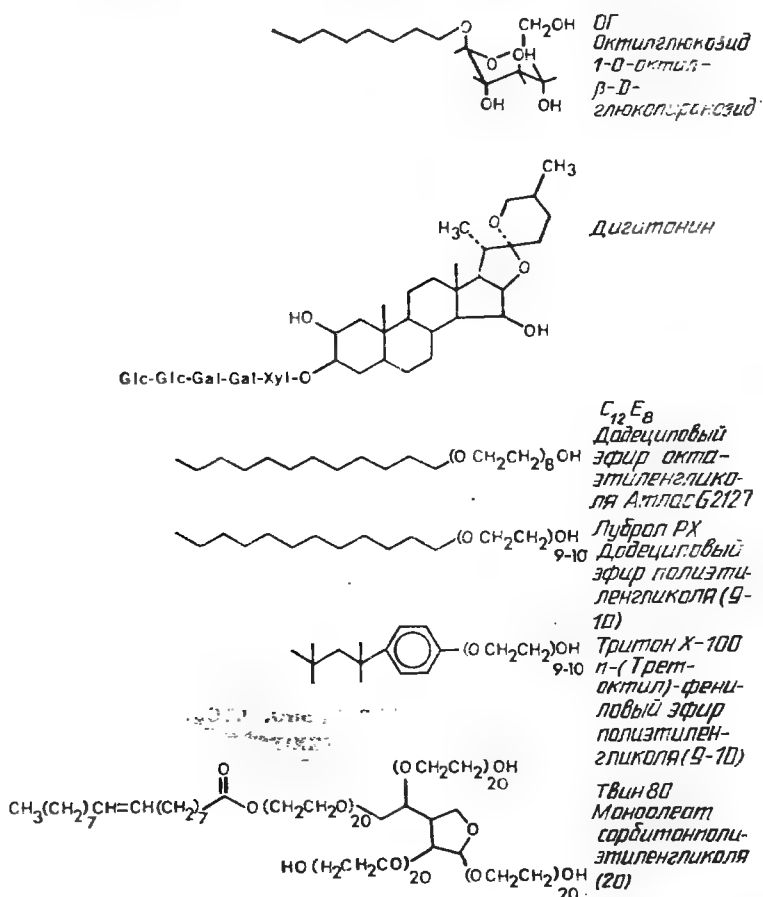


рис. 5.2) не удастся избирательно удалить липиды из мембран саркоплазматического ретикулума [12]; в то же время дигитонин лучше всего солюбилизирует как раз те мембраны, которые содержат холестерол [13, 14]. Поэтому любой новый детергент желательно проверять на возможность избирательной экстракции определенных мембранных компонентов. Анализ солюбилизованных липидов можно провести с помощью двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) [15] (гл. 3) либо газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) метиловых эфиров жирных кислот [16]. За экстракцией белков можно следить, определяя суммарный белок, а также измеряя характерную для этих белков ферментативную или лигандсвязывающую активность (разд. 4).

2.2. Выбор детергента

Успех солюбилизации, очистки и реконструкции часто зависит от выбора подходящего детергента. Выбор осложняется тем, что фирмы предлагают большой ассортимент различных детергентов, многие из которых идентичны, но продаются под разными названиями. В табл. 5.1—5.4 приведены названия и указаны некоторые свойства детергентов, чаще всего используемых в биохимических исследованиях. Вообще говоря, ни один из имеющихся детергентов не является универсальным. Это обусловлено тремя обстоятельствами: 1) сильными различиями в действии детергентов даже на одни и те же мембранные белки; 2) отсутствием единой стратегии солюбилизации и реконструкции; 3) сложным характером взаимодействий между молекулами белков, липидов и детергентов, имеющих столь разную химическую природу. Поэтому выбор детергента для солюбилизации и реконструкции в большей степени основан на имеющихся прецедентах его использования и на эмпирических представлениях, чем на научных принципах.

Существуют определенные требования к детергентам, применяемым для солюбилизации и реконструкции. Достоинства и недостатки многих распространенных детергентов приведены в обобщенном виде в табл. 5.2. В целом детергент должен солюбилизовать, но не денатурировать белок и должен быть легко доступен в чистом виде; желательно, чтобы детергент был недорогим. Фирмы, которые поставляют детергенты, перечисленные на рис. 5.2, указаны в табл. 5.3. При проведении многих исследований может возникнуть необходимость в количественном определении содержания детергентов. Легче всего это сделать с помощью радиоактивно меченных детергентов, фирмы-поставщики которых указаны в табл. 5.4. Важно подчеркнуть, что требования к детергенту при солюбилизации могут совершенно отличаться от требований, предъявляемых при реконструкции. Например, детергенты типа тритона X-100, которые хороши для солюбилизации биологических мембран, мало пригодны для реконструкции, поскольку их трудно удалять из солюбилизата (разд. 3). Рассмотрим факторы, важные для практического применения детергентов.

2.2.1. Структура и заряд детергентов

Детергенты обычно подразделяют на два основных типа: ионные и неионные (рис. 5.2). Ионные детергенты в свою очередь подразделяются на анионные (например, соли желчных кислот — холат и дезоксихолат), катионные (например, алкилтриметиламмониевые соли) и цвиттерионные (например, недав-

Таблица 5.1. Физико-химические свойства широко используемых детергентов

Детергент ¹⁾	Температура плавления, °С	Мол. масса мономера	Мол. масса мицеллы	ККМ ²⁾		Ссылки
				% (в/о)	М	
ДСН	206	288	18 000	0,23	$8,0 \cdot 10^{-3}$	[6, 7, 27]
Холат	201 ³⁾	430	4300	0,60	$1,4 \cdot 10^{-2}$	[4, 7, 17, 27]
Дезоксихолат	175)	432	4200	0,21	$5,0 \cdot 10^{-3}$	[7, 17, 27]
C ₁₅ -ТАБ	230 ³⁾	365	62 000	0,04	$1,0 \cdot 10^{-3}$	[6, 7, 27]
Лизо-ФХ (C ₁₆)	—	495	92 000	0,0004	$7,0 \cdot 10^{-6}$	[6, 7, 23]
СНАРS	157 ³⁾	615	6150	0,49	$1,4 \cdot 10^{-3}$	[4]
Цвиттергент 3-14	—	364	30 000	0,011	$3,0 \cdot 10^{-4}$	[4]
Октил-β-глюкозид	105 ³⁾	292	8000	0,73	$2,3 \cdot 10^{-2}$	[4]
Дигитонин	235 ³⁾	1229	70 000	—	—	[4, 7]
C ₁₂ E ₃	— ⁴⁾	542	65 000	0,005	$8,7 \cdot 10^{-5}$	[117]
Луброл РХ	— ⁴⁾	582	64 000	0,006	$1,0 \cdot 10^{-4}$	[4]
Тритон X-100	— ⁴⁾	650	90 000	0,021	$3,0 \cdot 10^{-4}$	[4, 6, 7]
Твин 80	— ⁴⁾	1310	76 000	0,002	$1,2 \cdot 10^{-5}$	[5]

1) Структурные формулы представлены на рис. 5.2.

2) Для кислоты.

3) С разложением.

4) Вязкая жидкость при комнатной температуре.

5) Определены при 20–25 °С.

Таблица 5.2. Характеристика широко используемых детергентов¹⁾

Характеристика	ДСН	С ₁₁	Хол	Дхол	Лизо	СНАРС	Цвнт	Огл	Диг	С ₁₂ Е ₈	Т80	Луб	ТрХ
Сильный денатурирующий агент ²⁾	+	+	—	—	+/—	—	+/—	—	—	—	—	—	—
Удаляется диализом	+	+	+	+	—	+	+/—	+	—	—	—	—	—
Содержит ионные группировки ³⁾	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Дает комплекс с ионами ⁴⁾	+	—	+	+	—	—	—	—	—	+/—	+/—	+/—	+/—
Поглощает при 280 нм ⁴⁾	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+/—	+/—	+/—
Затрудняет анализ ⁴⁾	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Осаждается на холоду	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Имеет высокую стоимость ⁵⁾	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Доступность ⁵⁾	+	+	+	+	+	+	+/—	+	+	+/—	+	+	+
Токсичность ⁶⁾	—	—	—	—	+/—	—	—	—	—	—	—	—	—
Легко очищается	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Радиоактивно меченный ⁷⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Известный состав	+	—	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+
Аутоокисление	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+

¹⁾ Обозначения: ДСН — додецилсульфат натрия; С₁₂ — гексадецилтриметиламмонийбромид; Хол — холат; Дхол — дезоксикхолат; Лизо — лизофосфатидилхолин; Цвнт — цвнтдетергент 3-14; Огл — октилглюкозид; Диг — дигитонин; Т80 — твин 80; Луб — лубрил РХ; ТрХ — тритон X-100. Структурные формулы приведены на рис. 5.1.

²⁾ Имеется в виду способность к разрушению вторичной и третичной структуры белка.

³⁾ Ионные детергенты не годятся для ионообменной хроматографии.

⁴⁾ См. текст.

⁵⁾ См. табл. 5.3.

⁶⁾ Все детергенты оказывают раздражающее действие на кожу и легкие и поэтому вредны. Дигитонин является сердечным гликозидом.

⁷⁾ См. табл. 5.4.

Таблица 5.3. Коммерческие препараты детергентов

Детергент ¹⁾	Цена ²⁾ , долл. США за 1 г	Чистота, %	Поставщик ³⁾
ДНС	0,14—0,64	98—100	A, C, F, S
C ₁₆ -ТАБ (C ₁₆)	0,08—0,11	95—100	A, F, S
Холат	0,17—1,2	96—99	A, C, F, S
Дезоксихолат	0,20—0,49	96—98	A, C, F, S
Лизо-ФХ (C ₁₆)	322—350	99—100	C, F, S
CHAPS	8—21	98—100	A, C, F, S
Цвиттергент 3-14	5,32	99—100	C
Дигитонин	9—22	75—99	A, C, F, S
Октилглюкозид	26—56	99—100	A, C, F, S
C ₁₂ E ₃	52	97	C
Луброл РХ	0,1	Неизвестно ⁴⁾	S
Твин 80	0,01—0,38	75—100	A, F, S
Тритон X-100	0,01—0,04	Неизвестно	A, C, F, S

¹⁾ Структурные формулы приведены на рис. 5.2.

²⁾ Цены приведены по каталогам за 1985—1986 гг. и являются приблизительными.

³⁾ A — Aldrich Chemical Co; C — Calbiochem; F — Fluka Chemicals; S — Sigma Chemical Co. Перечислены только основные поставщики в США и Англии.

⁴⁾ Вероятно, выше 95%.

но предложенный детергент CHAPS). Неионные детергенты включают такие вещества, как октил-β-D-глюкопиранозид (октилглюкозид) и полиоксиэтиленовые производные типа тритона X-100, луброла РХ и твинов.

Молекулы всех детергентов, как правило, имеют две пространственно четко разграниченные области: гидрофобную и гидрофильную. Характерно, что у неионных детергентов размер полярной области (часто это не имеющая заряда полиоксиэтиленовая цепь) обычно намного больше, чем у ионных. Интересной особенностью солей желчных кислот, как видно из их стереохимических формул, является то, что гидрофильная и гидрофобная области молекулы расположены по разные стороны циклопентанпергидрофенантронового ядра [17].

Работая с детергентами полиоксиэтиленового ряда, следует учитывать, что имеющиеся в продаже препараты могут быть гетерогенными по размеру полиоксиэтиленовых цепей. Это связано с особенностями протекания реакции полимеризации в процессе химического синтеза таких детергентов. Кроме того, полиоксиэтиленовые производные склонны к автоокислению, особенно в присутствии ионов тяжелых металлов [18]. Автоокисление можно предотвратить добавлением 0,2 мол. % бутилированного гидрокситолуола, который действует как ловушка для свободных радикалов. Заряд детергента также имеет большое значение, тем более если в процессе выделения белка прихо-

дится прибегать к ионообменной хроматографии. Кроме того, некоторые заряженные детергенты, например соли желчных кислот, образуют нерастворимые комплексы с ионами двухвалентных металлов и осаждаются при низких рН (рН 6,8) из-за наличия у них карбоксильной группы [17, 19].

Другая особенность работы с детергентами состоит в том, что в их присутствии анализ солюбилизированного материала может быть затруднен. Например, многие неионные детергенты содержат значительные примеси фосфатов, что создает серьезные проблемы при липидном анализе. Другие детергенты, главным образом из ряда тритонов, сильно поглощают УФ-свет (280 нм) из-за наличия в молекуле бензольного кольца, что затрудняет спектрофотометрическое определение белка [20]. Эту проблему позволяет решить использование насыщенных аналогов тритона (Aldrich Chemical Co.). Многие детергенты затрудняют определение белка с помощью колориметрических методов. В некоторых случаях детергент влияет на реакционную способность одного или нескольких компонентов в инкубационной среде, например, из-за включения лиганда или субстрата в мицеллярную фазу. Показано также, что примеси, имеющиеся в полиоксиэтиленовых детергентах, ингибируют очищенную дофамин- β -монооксигеназу [21] и аденилатциклазу [22].

2.2.2. Критическая концентрация мицеллообразования

Все амфифильные вещества способны образовывать мицеллярные структуры. Мицеллами называют термодинамически устойчивые коллоидные агрегаты, самопроизвольно образующиеся при определенной концентрации амфифила, называемой критической концентрацией мицеллообразования (ККМ), и при температурах выше критической температуры мицеллообразования [7]. Ниже ККМ амфифилы диспергированы в мономерной форме. В литературе имеются прекрасные обзоры по термодинамике, структуре и свойствам детергентных и детергент-мембранных мицелл [6, 17, 23—25]. Рассмотрение этих вопросов не входит в круг задач данной главы. Однако понятие о мицеллообразовании имеет определенное отношение к проблемам солюбилизации и реконструкции мембран, так как, по-видимому, существует связь между величиной ККМ данного детергента и его концентрацией, вызывающей солюбилизацию [26].

ККМ прямо и косвенно связана с реконструкцией. Например, концентрация детергента, вызывающая солюбилизацию, зависит от действия тех же факторов, которые влияют на величину ККМ (см. ниже). Косвенная связь проявляется в том, что детергенты с более высокой ККМ легче удаляются диализом.

Таблица 5.4. Коммерческие препараты радиоактивно меченных детергентов и поставляющие их фирмы

Детергент	Метка	Цена ¹⁾ долл. США за 1 мКи	Источник ²⁾
ДСН	³⁵ S	0,8	Am
	¹⁴ C	4,5	RPI
Холат	³ H	0,5	NEN
	¹⁴ C	4,0—6,3	Am, NEN, RPI
Дезоксихолат	¹⁴ C	3,4—5,8	Am, ICN
Лизо-ФХ (C ₁₆)	¹⁴ C	16,7—33,5	Am, NEN
Октилглюкозид	¹⁴ C	1,0 ³⁾	ARC ³⁾
C ₁₂ E ₈	¹⁴ C	5,0	RPI
Тритон X-100	³ H	1,0	NEN
Твин 80	¹⁴ C	2,80	RI

¹⁾ Цены приведены по каталогам за 1985—1986 гг. и являются приблизительными.

²⁾ Условные обозначения: Am — Amersham Radiochemicals; NEN — New England Nuclear; RPI — Research Products International; ARC — American Radiolabeled Chemicals.

³⁾ Синтез октилглюкозида осуществляется по заказу. По последней заявке стоимость 4 мКи составила 4000 долларов. Фирма American Radiolabeled Chemicals поставляет реактивы по заказам намного дешевле, чем другие компании.

зом, чем детергенты, имеющие низкую ККМ. Удаление детергента является ключевой стадией реконструкции и будет рассмотрено в разд. 3. ККМ некоторых детергентов, широко применяемых при реконструкции, приведены в табл. 5.1 (более подробные данные см. в работе [27]).

ККМ зависит от многих факторов. Наиболее существенное влияние оказывают изменения в полярной и в неполярной областях детергентной молекулы [25]. ККМ снижается при увеличении размера неполярной области. Этой тенденции противодействуют такие изменения структуры, которые нарушают упаковку молекул детергента. Например, наличие двойных связей или разветвлений в углеводородной цепи способствуют возрастанию ККМ. Нарушения упаковки происходят и при модификации полярной области молекулы. Электростатическое отталкивание между полярными группами заряженных детергентов увеличивает их ККМ приблизительно в 100 раз по сравнению с соответствующими незаряженными аналогами [25]. Увеличение ионной силы раствора приводит к снижению ККМ, особенно в случае ионных детергентов [28]. Повышение температуры слабо влияет на ионные детергенты (выше критической температуры мицеллообразования), но приводит к заметному снижению ККМ неионных детергентов, вероятно, за счет ослабления гидрофобных взаимодействий [7, 21, 24].

При увеличении концентрации детергента в растворе до величин, намного превышающих ККМ, размер мицелл растет до

тех пор, пока они не начнут агрегировать и выпадать в осадок. Температура, при которой это происходит, называется «точкой помутнения». Такую особенность поведения детергентов можно использовать для солюбилизации и очистки некоторых мембранных белков. Тритон X-114, например, имеет точку помутнения примерно 20 °С. Мембранные белки, солюбилизованные тритоном X-114 при 0 °С, будут осаждаться при 20 °С, что дает возможность осуществить в одну стадию их избирательную солюбилизацию и частичную очистку [29]. Описание этого методического приема дано в разд. 2.2.1 гл. 6.

2.3. Факторы, влияющие на стабильность солюбилизованных мембранных белков

2.3.1. Соотношение липид — детергент — белок

Константы связывания детергента с мембраной трудно измерить из-за неидеальности смеси, поэтому не удастся и напрямую связать величину ККМ детергента с его способностью взаимодействовать с липидно-белковыми мембранами и вызывать их солюбилизацию [8]. Однако трудности точного математического описания процесса солюбилизации не помешали развитию методов реконструкции, а накопленный при этом практический опыт был использован для разработки полуколичественных подходов.

В большинстве случаев перед исследователем стоит задача добиться максимальной солюбилизации белка и сохранить при этом его функциональную активность. Наиболее эффективный путь для достижения этой цели состоит в том, чтобы изучить процесс солюбилизации в широком диапазоне отношений детергент — липид, и такие эксперименты следует рассматривать как необходимый этап любой работы по солюбилизации/реконструкции мембран. Обычно легче измерить концентрацию белка, чем липида, поэтому в литературе часто указывают отношение детергент/белок. Поскольку степень солюбилизации зависит как от концентрации липида, так и от концентрации детергента в мицеллярном состоянии, было бы полезно ввести некий параметр, характеризующий эффективную концентрацию детергента. В последнее время было предпринято несколько таких попыток. Наибольший интерес вызывает параметр ρ , предложенный в работе [26]:

$$\rho = \frac{[\text{Детергент}] - \text{ККМ}_{\text{фл}}}{[\text{Фосфолипид}]},$$

где $\text{ККМ}_{\text{эфф}}$ означает ККМ, измеренную при определенных экспериментальных условиях. Введение $\text{ККМ}_{\text{эфф}}$ вместо просто

ККМ объясняется тем, что последняя часто снижается в присутствии липидов и белков [23], однако на практике чаще всего берут литературные значения ККМ (см. табл. 5.1). С помощью параметра ρ пытаются выразить молярное отношение детергента, находящегося в мицеллярном состоянии, к взятому фосфолипиду. К сожалению, из-за действия ряда факторов на процесс реконструкции трудно рассчитать и сравнить значения ρ для различных белков, описанных в литературе, но некоторые обобщения все же можно сделать. Например, есть основания полагать, что с ростом ρ степень солюбилизации будет возрастать. В случае рецептора IgE она достигает 90% при $\rho > 2$. Однако с увеличением ρ возрастает вероятность денатурации белка. Для ацетилхолинового рецептора и рецептора IgE оптимальными являются значения ρ от 2 до 10 (большая часть экспериментов по реконструкции проведена при значениях ρ около 2). Когда мембраны, содержащие ацетилхолиновый рецептор (2,5 мг/мл белка, 1,2 мМ нативного фосфолипида), солюбилизируют в 1%-ном (в/о) холате, т. е. при $\rho = 9$, функция ионного канала после реконструкции восстанавливается. Если же концентрацию холата поднять до 2% (в/о), когда ρ составляет около 29, то происходит заметная инактивация ионных каналов, хотя остальные экспериментальные условия остаются такими же [30]. Для карнитин/ацилкарнитин-трансферазы как при солюбилизации, так и при реконструкции оптимальными являются значения ρ от 1,5 до 2,0 [31]. К сожалению, все обстоит намного сложнее, чем можно было бы ожидать на основании только рассмотрения значений ρ , поскольку этот параметр не учитывает специфики липид-детергентных взаимодействий.

2.3.2. Влияние липидов на стабильность белков

Роль фосфолипидов в стабилизации мембранных белков начинает проявляться только сейчас [32], хотя уже давно известно, что полное удаление липидов из биологических мембран сопровождается инактивацией большинства мембранных белков [33—35] даже в присутствии детергентов. Иногда полное удаление липидов в условиях солюбилизации (или реконструкции) приводит к агрегации и осаждению белков.

Важность липидов для стабилизации белков предопределяет некоторые практические меры, которые можно предпринять, чтобы свести к минимуму денатурацию. Самые простые способы связаны с учетом свойств используемых детергентов. Например, делипидизирующую активность некоторых детергентов можно снизить, меняя такие параметры, как температура, ионная сила и pH. Еще один путь — простое уменьшение концентрации детергента, однако это может повлиять на эффективность

солюбилизации. Если детергент должен быть использован в высокой концентрации, то может оказаться полезным сократить время нахождения белка в детергентном растворе, применяя, например, методы быстрой реконструкции.

Делипидизация белков, происходящая при их очистке на аффинных сорбентах, иногда представляет серьезную проблему, и чтобы решить ее, возможно, потребуется добавлять липиды во все элюирующие растворы [36, 37]. Во многих случаях присутствия собственных липидов в солюбилизируемом препарате бывает достаточно, чтобы защитить белки от денатурирующего действия детергентов. Однако при добавлении «защитных» липидов солюбилизацию можно проводить и при таких концентрациях детергента, которые в других условиях вызвали бы денатурацию [38, 39]. По-видимому, защитные липиды снижают фактор ρ . Пока неясно, одинаковы или нет защитные функции разных липидов. Однако не вызывает сомнений, что чувствительность некоторых белков к денатурации может зависеть от комбинации детергента и липида. Например, рецептор IgE более подвержен денатурации при использовании в качестве детергента CHAPS в сочетании с азолектином, чем в комбинации с нативными липидами опухолевого происхождения [26]. Другой пример: ацетилхолиновый рецептор был успешно реконструирован при использовании октилглюкозида в сочетании с нативными липидами *Torpedo*, но, когда октилглюкозид был взят вместе с азолектином, наблюдалась инактивация белка [40]. В связи с этим интересной представляется идея о том, что успех применения CHAPS, холата и дигитонина обусловлен способностью этих стероидных производных заменять холестерол — липид, который, вероятно, стабилизирует некоторые мембранные белки [41].

2.3.3. Влияние лигандов на стабилизацию функциональной активности белков

Особенность многих мембранных белков состоит в том, что они могут находиться в нескольких конформационных состояниях, которые характеризуются разным сродством к определенным лигандам. Примерами таких белков являются рецепторы [42, 43], ферменты [44, 45] и ионные каналы [46]. Переход между конформационными состояниями часто связан с изменениями липидного окружения [47—49], и солюбилизация может оказаться благоприятной для одного состояния в ущерб другим. Часто детергенты необратимо изменяют характер сродства в пользу некоторого вырожденного состояния, которое возникает вследствие денатурации, обусловленной удалением липидов по механизмам, обсуждавшимся выше. Нередко денатурацию

Таблица 5.5. Выделение мембран из электрических органов *Torpedo californica* (см. также табл. 3.6)

Все операции выполняют при 0—4 °C как можно быстрее.

1. Частично размораживают 200 г электрических органов *T. californica*, нарезают ножницами или скальпелем на небольшие куски (1 см³) и помещают их в стакан емкостью 600 мл.
2. Добавляют 200 мл буфера для гомогенизации (БГ-4, см. ниже).
3. Добавляют, постоянно перемешивая, 0,4 г иодацетата и 0,2 мл 200 мМ ФМСФ (в этаноле), чтобы получить концентрацию иодацетата 1 мг/мл и ФМСФ 0,1 мМ (оба вещества являются протеазными ингибиторами).
4. Гомогенизируют четыре раза по 30 с с помощью гомогенизатора политрон PCU-2 (фирмы Brinkmann) на уровне мощности 7.
5. Центрифугируют при 5500 об/мин (5000 g) в течение 10 мин в роторе Sorvall GSA [или при 6500 об/мин (5000 g) в роторе SS-34].
6. Фильтруют надосадочную жидкость через четыре слоя марли.
7. При желании можно ресуспендировать осадок, полученный после центрифугирования, в 80 мл буфера БГ-4 и повторить операции 3—6, добавив 0,2 г иодацетата и 0,1 мл ФМСФ.
8. Объединенный фильтрат центрифугируют в роторе Ty 35 (Beckman) при 30 000 об/мин в течение 60 мин или в роторе Ty 19 при 19 000 об/мин в течение 125 мин. (При крупномасштабном выделении может потребоваться несколько центрифугирований в роторе Ty 35.)
9. Суспендируют осадок в 5—10 мл буфера для диализа (БД-1). Чтобы получить гомогенную суспензию, следует использовать ручной гомогенизатор. Разливают суспензию по морозостойким пробиркам и замораживают в жидком азоте.

Буфер для гомогенизации БГ-4

10 мМ фосфат натрия (1,38 г NaH₂PO₄ на 1 л)
5 мМ ЭДТА (1,85 г/л)
5 мМ ЭГТА (1,90 г/л)
0,02%-ный NaN₃ (0,2 г/л)
pH 7,5

Буфер для диализа (БД-1)

100 мМ NaCl (5,84 г/л)
10 мМ MOPS (2,09 г/л)
0,1 мМ ЭДТА (0,037 г/л)
0,02%-ный NaN₃ (0,2 г/л)
pH 7,4

можно предотвратить, включая в солюбилизирующие смеси лиганды или субстраты. Эти лиганды, по-видимому, фиксируют белок в стабильном конформационном состоянии. Например, эксперименты, проведенные с β-андренэргическим рецептором, показывают, что именно агонисты, но не антагонисты, оказывают защитное действие на белок в ходе солюбилизации дезоксихолатом [50]. Подобная стабилизация наблюдалась при реконструкции АТРаз за счет включения АТР в инкубационную среду [33, 51] и сукцинатдегидрогеназы за счет добавления сукцината [52].

Таблица 5.6. Солюбилизация и очистка ацетилхолинового рецептора электрического органа *Torpedo*

Все операции проводят при 0—4 °С.

1. Размораживают фракцию мембран *Torpedo*, выделенную из 200 г электрических органов.
2. Разбавляют препарат до концентрации 2 мг/мл по белку буфером БД-1 (см. табл. 5.5) (для мембран, выделенных из 200 г ткани, достаточно 200 мл).
3. Постоянно перемешивая, добавляют 10 мл 20%-ного холата натрия (в буфере БД-1), чтобы конечная концентрация холата составила 1%.
4. Осторожно перемешивают в течение 20 мин.
5. Центрифугируют при 34 000 об/мин в роторе Ту 35 в течение 45 мин. За это время подготавливают колонку для аффинной хроматографии для очистки ацетилхолинового рецептора, промыв ее буфером (см. п. 7).
6. Отделяют надосадочную жидкость и оставляют ее для дальнейшей очистки с помощью аффинной хроматографии на колонке.
7. Промывают колонку с аффигелем 401/бромацетилхолином буфером БД-2 (БД-1+1%-ный холат). (Процедура подготовки колонки описана в табл. 5.7.)
8. Наносят надосадочную жидкость на колонку (объемом 25 мл) со скоростью 1,5 мл/мин.
9. Пропускают через колонку не менее трех объемов (75 мл) буфера БД-3 (БД-1+1%-ный холат+1 мг/мл ДОФХ)¹⁾.
10. В ходе промывания собирают фракции и измеряют их оптическую плотность при 280 нм. В конце промывки оптическая плотность должна быть на уровне базовой линии.
11. Элюируют ацетилхолиновый рецептор 50 мл буфера БД-4 (БД-3+10 мМ карбамилхолинхлорид), приготовленного растворением 91 мг твердого карбамилхолинхлорида в 50 мл буфера БД-3. Собирают фракции по 2 мл, измеряя их оптическую плотность при 280 нм.
12. Объединяют фракции, составляющие хроматографический пик (обычно это фракции с $A_{280} > 0,5$), и определяют общий объем и среднее значение A_{280} . Концентрацию белка (в мг/мл) рассчитывают как $0,6 \cdot A_{280}$.
13. Хранят очищенный ацетилхолиновый рецептор при 0—4 °С. Очищенные фракции как можно быстрее используют для реконструкции.
14. Промывают колонку несколькими объемами буфера БД-1, а затем 0,01 М уксусной кислотой (рН 4).

¹⁾ ДОФХ (фирма Avanti) высушивают в вакууме и суспендируют в буфере БД-1+1%-ный холат. Обычно 10 мл раствора ДОФХ (20 мг/мл в хлороформе) упаривают на роторном испарителе, сушат 1—3 ч в вакуумном эксикаторе и затем растворяют в 200 мл буфера БД-3. 50 мл буфера БД-3 оставляют для стадии 11. В случае необходимости именно на этой стадии можно заменить один липид на другой или довести соотношение липид : белок до нужной величины.

Таблица 5.7. Подготовка колонки для очистки ацетилхолинового рецептора с помощью аффинной хроматографии

Для мембранного препарата, выделенного из 200 г ткани, пригодна колонка объемом 25 мл. Описанная ниже методика рассчитана на колонку объемом 50 мл, так как фирма Bio-Rad поставляет смолу аффигель 401 партиями по 50 мл. Эту методику можно модифицировать для проведения очистки в меньшем масштабе.

1. К 50 мл аффигеля (Bio-Rad), помещенного в колонку размером 1,5×20 см типа Econo-Column (Bio-Rad), добавляют 50 мл 20 мМ дитиотрептола (ДТТ) в 0,1 М трис-буфере, рН 8,0. Хорошо перемешивают и оставляют на 20 мин¹⁾.

2. Промывают колонку водой, чтобы удалить ДТТ. Анализируют гель и последнюю порцию промывающего раствора на присутствие сульфгидрильных групп (см. ниже). Их содержание в этом растворе должно быть на уровне фона.
3. Добавляют к гелю, находящемуся в колонке, равный объем буфера, содержащего 100 мМ NaCl и 50 мМ фосфат натрия, pH 7. Хорошо перемешивают, добавляют 300 мг бромацетилхолина и сразу же перемешивают суспензию геля встряхиванием. Оставляют реакционную смесь на 30 мин, периодически встряхивая. (Высокая концентрация фосфата необходима для поддержания pH 7.) Получение бромацетилхолина описано в конце таблицы.
4. Промывают колонку водой и проводят анализ геля на содержание свободных сульфгидрильных групп. Их содержание в геле должно быть очень низким. Если необходимо, повторяют обработку бромацетилхолином.
5. Добавляют 50 мг иодацетамида, чтобы произошло алкилирование всех оставшихся сульфгидрильных групп и был подавлен рост микроорганизмов. Хранят колонку до тех пор, пока она не понадобится.
6. Колонку можно использовать несколько раз (обычно три раза в течение 3—4 нед). Чтобы свести гидролиз лиганда к минимуму, колонку заполняют буфером с низкой ионной силой при pH 4. Если выход очищенного ацетилхолинового рецептора становится ниже 50% от оптимального, пора готовить новую колонку.

Анализ на сульфгидрильные группы

1. Готовят исходный 10 мМ раствор дитионитробензоата (ДТНБ) и хранят его в замороженном состоянии (39,6 мг на 10 мл, осторожно титруют NaOH до pH 7).
2. Добавляют 0,33 мл 10 мМ ДТНБ к 10 мл 0,1 М трис-буфера, pH 8,0.
3. К 50 мкл геля или к 50 мкл элюата добавляют 1 мл разбавленного раствора ДТНБ. (Чтобы пластмассовый наконечник микропипетки не забивался сгустками геля, срезают его кончик.)

Качественную оценку можно проводить по изменению окраски; восстановленный гель имеет ярко-желтый цвет. После иммобилизации бромацетилхолина гель не должен окрашиваться. Количественный анализ можно проводить, измеряя оптическую плотность при 412 нм для взвешенного образца геля, из которого отсасыванием удален избыток буфера. Однако в большинстве случаев достаточно качественной реакции.

Получение бромацетилхолина

К 18,4 г (0,1 моля) твердого холинбромида добавляют по каплям при постоянном перемешивании 24,2 г (0,1 моля) бромацетилбромида. Реакционную смесь выдерживают в течение 40 мин. Вязкую смесь охлаждают в ледяной бане и перемешивают еще 75 мин. Затем к смеси медленно добавляют 75 мл абсолютного этанола. Белый кристаллический осадок отфильтровывают при отсасывании. При перекристаллизации из 400 мл изопропанола получают кристаллы с температурой плавления 136—138 °C. Выход обычно составляет 24 г

¹⁾ Эта операция проводится для того, чтобы гарантировать перевод геля в восстановленное состояние, однако она не является обязательной. Ее, как и последующие стадии, можно проводить в пробирке или в стакане. По нашему мнению, все операции удобно проводить прямо в колонке.

2.4. Солюбилизация и очистка никотинового ацетилхолинового рецептора из *Torpedo californica*

В качестве иллюстрации к общим правилам, рассмотренным выше, в табл. 5.5, 5.6 и 5.7 детально описан процесс очистки ацетилхолинового рецептора (АцХР) *Torpedo*. Обычно из 200 г

электрических пластинок можно получить приблизительно 20 мг очищенного АцХР. Обратите внимание, что липиды специально добавляют в детергентный раствор на стадии аффинной хроматографии. Если липиды исключить, очистка протекает нормально, но выделенный препарат АцХР не дает функционально активные ионные каналы при последующей реконструкции.

3. Общая стратегия реконструкции мембранных белков

В идеале конечный продукт реконструкции должен представлять собой суспензию моноламеллярных везикул одного размера, имеющих одинаковое соотношение липид/белок. Везикулярный бислой должен иметь такую же проницаемость, как и нативная мембрана: везикулы должны сохранять захваченные непроницающие ионы или молекулы и иметь достаточный внутренний объем, чтобы можно было измерить содержание захваченных ими веществ. Везикулы не должны содержать остаточного детергента. Мембранные белки должны быть ориентированы и встроены в бислой таким же образом, как и в нативной мембране. Бислой должен иметь такой состав, который необходим для сохранения функциональной активности, присущей нативному белку. Хотя все эти требования редко удается выполнить полностью, тем не менее с помощью реконструированных систем можно получить много полезной информации о структуре и функциях мембран и белков. Кроме того, здесь всегда есть неограниченный простор для дальнейших усовершенствований.

3.1. Общие методы реконструкции

Реконструкцию обычно начинают, взяв смешанные мицеллы, состоящие из очищенного белка, детергента и липида (эндогенного или экзогенного). Иногда мицеллы состоят только из белка и детергента: необходимость липида для стабилизации исследуемого белка можно установить, как описано выше. Если липид не был добавлен в процессе солюбилизации или очистки белка (или если требуется добавить его дополнительно), то это, как правило, делают на стадии приготовления мицеллярного раствора, чтобы получить конечное мольное отношение липид/белок (обозначаемое здесь как ϕ), равное 2000—10 000. Такой избыток липида обычно требуется тогда, когда реконструированные везикулы используют для исследований транспортных процессов, хотя в некоторых случаях более приемлемыми могут быть отношения 100—2000. Липид можно добавить в виде детергент-липидных мицелл или наслоить его на дне колбы в виде тонкой пленки, над которой затем перемешивать детер-

гент-белковый раствор до тех пор, пока в него не перейдет весь липид. Желательно все липидные суспензии хранить в атмосфере инертного газа.

3.1.1. Удаление детергента

Для формирования везикул необходимо удалить детергент из смешанных мицелл, так чтобы самопроизвольно мог образоваться фосфолипидный бислой. Чаще всего детергент удаляют с помощью диализа. Мицеллярный раствор наливают в целлофановый мешочек и диализуют против большого объема буфера, не содержащего детергента (обычно на холоду). Как правило, используют 200-кратный избыток буфера по отношению к объему диализуемого раствора с тремя или четырьмя сменами в течение нескольких суток. Преимущество этого метода состоит в его простоте: можно одновременно диализовать несколько образцов (содержащих, например, различные липиды), при этом не требуется ни специального оборудования, ни особого контроля за ходом диализа. Недостаток состоит в том, что для удаления детергента требуется много времени. Кроме того, что это создает определенные неудобства, длительный контакт с детергентом может привести к повреждению некоторых мембранных белков. По-видимому, образование детергент-белковых мицелл неизбежно происходит даже при избытке липида (рис. 5.1). Если по каким-либо причинам ингибиторы протеолитических ферментов не были добавлены при солюбилизации или очистке белка, то может оказаться полезным добавить их на стадии удаления детергента.

Скорость удаления детергента зависит от многих факторов, но в любом случае надо стремиться к тому, чтобы остаточное содержание детергента не превышало 0,02% (в/о) или было в 100 раз ниже первоначального уровня. По-видимому, чаще всего при диализном методе реконструкции в качестве детергента используют холат. Тритон X-100 трудно удалить диализом, поскольку этот детергент имеет низкую ККМ. Поэтому его редко применяли для реконструкции, пока не выяснилось, что гидрофобные смолы биобидс SM-2 и амберлит XAD-2, адсорбирующие детергенты, могут ускорить удаление тритона X-100 [53, 33]. С этой целью предварительно промытые смолы просто добавляют к диализующему буферу. Такой способ удаления детергента был использован для реконструкции натриевого канала [37].

При другом методе реконструкции смешанный мицеллярный раствор разбавляют до концентрации ниже ККМ солюбилизирующего детергента, в результате чего липиды и белки ассоциируют с образованием везикул. Оставшийся в везикулах детер-

гент можно затем удалить гель-фильтрацией или кратковременным диализом. Этот подход впервые применялся для реконструкции цитохромоксидазы, солюбилизированной холатом [54], а недавно был использован для реконструкции родопсина [55]. Процедура реконструкции состоит в следующем.

1. Не содержащий липидов родопсин, солюбилизированный октилглюкозидом, добавляют к тонкой пленке яичного фосфатидилхолина (ФХ) ($\varphi=80-300$), перемешивают на встряхивателе типа вортекс и выдерживают при 4°C в течение 4 ч.

2. Полученный раствор добавляют по каплям к быстро перемешиваемому буферу так, чтобы снизить концентрацию октилглюкозида до 10 мМ ($\rho < -9$).

3. Удаляют детергент диализом против 18-кратного избытка буфера и концентрируют везикулы на мембране амикон РМ-10.

Детергент можно также удалить с помощью гель-фильтрации липидно-белково-детергентного раствора. По мере прохождения смеси через колонку концентрация детергента в ней снижается, благодаря чему формируются липидно-белковые везикулы. Гель-фильтрация оказалась очень эффективной при реконструкции таких мембранных белков, как АцХР [28], Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза [9] и белок, участвующий в транспорте лактозы [56]. Преимуществом этого метода реконструкции является быстрота, однако он мало пригоден в случае большого числа образцов. Кроме того, удаление детергента гель-фильтрацией приводит к более широкому распределению частиц по размеру, чем в случае диализа [57]. Более полный перечень методов удаления детергентов можно найти в обзоре [58].

3.1.2. Реконструкция путем включения белка в уже сформированные везикулы

Реконструкция путем включения мембранных белков в заранее сформированные везикулы была успешно осуществлена в нескольких случаях. Этот способ (рис. 5.4, Б) приводит к более однородной ориентации белка в везикулах [59]. Белки с небольшими гидрофобными «хвостами», такие, как колицин Ia или цитохром b_5 , включаются в липосомы спонтанно, при этом часто требуются липиды вполне определенного типа. Таким методом была проведена, например, реконструкция асиалогликопротеинового рецептора печени [60].

Иногда предварительно полученные липосомы смешивают с белками, солюбилизированными детергентом, как, например, при реконструкции гуанилатциклазы [61].

1. К липидам в виде тонкой пленки добавляют буфер так, чтобы их конечная концентрация была в пределах 1—10 мМ.

2. Мутную суспензию диспергируют с помощью ультразвука, пока раствор не станет прозрачным. Для этого может потребоваться несколько часов. Обработку ультразвуком следует проводить в атмосфере азота или аргона (более детальное описание см. в работе [62]).

3. Мембраносвязанную форму гуанилатциклазы, очищенную и солюбилизованную в 0,1%-ном луброле РХ, инкубируют с липосомами в течение 1—5 ч и затем выделяют реконструированные везикулы центрифугированием при 300 000 *g* в течение 30 мин (другой вариант этого метода см. ниже при описании методики замораживания — оттаивания).

Измерения ферментативной активности во фракции везикул показали, что в отличие от некоторых других мембранных белков, описанных в данной главе, гуанилатциклаза в липосомах имеет V_{max} в 10 раз ниже, чем в растворимой форме. При этом ферментативная активность сильно зависит как от состава фосфолипидов, так и от природы входящих в них жирных кислот, хотя прямой зависимости этих эффектов от длины и степени ненасыщенности жирнокислотных цепей не было обнаружено.

3.1.3. Реконструкция с помощью обработки ультразвуком и процедуры замораживания — оттаивания

Метод реконструкции, при котором детергент совсем не используется, основан на процедурах обработки ультразвуком и замораживания — оттаивания. Аликвоту белка, не содержащую липидов и детергента, смешивают с водной дисперсией липидов. Смесь обрабатывают ультразвуком [63] или быстро замораживают в жидком азоте, затем оттаивают и снова используют ультразвук [64]. Этот метод хорош тем, что является быстрым и не требует использования детергентов. Однако он имеет ограничения применения, поскольку большинство мембранных белков при удалении липидов и детергентов подвергаются необратимой денатурации. Денатурация может также произойти под воздействием ультразвука в течение нескольких секунд. Кроме того, различия в мощности и конструкции ультразвуковых установок очень затрудняют стандартизацию условий озвучивания.

Рассмотрим, как с помощью комбинированного подхода был реконструирован комплекс, содержащий хлорофилл *a/b* [65]. Мембраны хлоропластов солюбилизировали в 1,5%-ном тритоне X-100 при конечной концентрации хлорофилла 3 мМ. Полученную суспензию добавляли к равному объему липидов (10 мг/мл), обработанных ультразвуком, перемешивали и затем три раза проводили операцию замораживания — оттаивания. Остатки тритона X-100 удаляли смолой биобидс SM-2, образец центри-

фигуровали для отделения смолы и затем трижды замораживали — оттаивали. В результате были получены преимущественно моноламеллярные везикулы с небольшой примесью более крупных мультламеллярных фрагментов.

3.2. Морфологическая характеристика везикул

Для полной характеристики реконструированной системы необходимо знать морфологию полученных частиц. В идеале реконструированные везикулы должны быть гомогенными по форме, размеру и характеру распределения в них белка. Однако на деле при реконструкции нередко образуется гетерогенная смесь как липидных, так и липидно-белковых везикул, что может серьезно осложнить изучение белков, выполняющих транспортные функции [40]. В этом разделе описаны некоторые методы, широко используемые для морфологической характеристики везикул.

3.2.1. Электронная микроскопия

Визуальный анализ реконструированных мембран с помощью электронной микроскопии — это самый лучший способ характеристики частиц, присутствующих в образце, по размеру и форме. Чаще всего используют два метода — негативное контрастирование и замораживание — скалывание. Детальное описание этих методов не входит в задачи данной главы (оно дано в работе [66]), но в ней рассмотрены их преимущества и недостатки. Приемы, используемые для характеристики липидных везикул, как правило, применимы и для реконструированных мембран, хотя реагенты, используемые для негативного контрастирования, могут быть иными.

При подготовке препарата для проведения электронной микроскопии методом негативного контрастирования разбавленную суспензию реконструированных мембран (обычно в концентрации 0,1 мг липида в 1 мл) наносят на медную сеточку, покрытую полимерной пленкой типа парлодия или формвара. На пленку напылен углерод в качестве подложки. Образец, находящийся на сеточке, обрабатывают контрастирующим раствором соли тяжелого металла (уранилацетат или фосфовольфрамат натрия), и затем излишки раствора удаляют фильтровальной бумагой. При контрастировании реконструированных везикул концентрацию и pH промывающего и контрастирующего растворов подбирают так, чтобы морфология везикул по возможности не претерпевала изменений [67]. Метод негативного контрастирования является очень быстрым (требуется всего около 30 мин на один препарат от момента его приготовления

до просмотра в электронном микроскопе); он позволяет просмотреть за несколько часов большое число образцов. Еще одно его преимущество в том, что можно проводить анализ изображений с довольно высоким разрешением (см., например, рис. 5.3) — при условии, что дозы облучения электронами не настолько велики, чтобы вызвать радиационное разрушение образца. В частности, по электронным микрофотографиям, получаемым с помощью метода негативного контрастирования, обычно проводят анализ изображений с целью реконструкции трехмерной структуры мембранных белков [68].

При электронной микроскопии методом замораживания — скалывания осажденный центрифугированным препарат реконструированных мембран быстро замораживают и затем скалывают, так что при этом обнажается внутренняя часть бислоя. На поверхность скола под углом 45° напыляют платину, а под прямым углом — углерод в качестве подложки. Полученная таким образом платиново-углеродная реплика отражает рельеф мембранной поверхности, являясь ее точной копией. Интегральные мембранные белки проявляются как выпуклости либо углубления на реплике, при этом далеко не всегда каждая выпуклость (или внутримембранная частица, ВМЧ) соответствует одному белку: нередко несколько белков ассоциируют, образуя ВМЧ. Преимущества этого метода состоят в том, что с его помощью можно более точно охарактеризовать распределение белка в бислое и установить, является ли везикула моноламеллярной или многослойной, а также включены ли внутрь ее белки. Недостаток же в том, что его разрешающая способность ограничена размерами платиновых гранул, покрывающих поверхность белка, поэтому количественная оценка размера внутримембранных частиц затруднительна, хотя и не является абсолютно невозможной. Кроме того, возникают проблемы и при нахождении распределения везикул по размеру, поскольку их кажущийся диаметр зависит от того, как проходит скол через везикулы. Истинному диаметру везикул отвечают только наибольшие из наблюдаемых размеров.

Большие успехи были достигнуты за последнее время в развитии криоэлектронной микроскопии. Можно надеяться, что этот метод внесет значительный вклад в визуальный анализ реконструированных мембран [69]. Суть метода заключается в следующем. Водную суспензию изучаемого препарата наносят на не покрытую полимером сеточку, избыток жидкости удаляют с помощью фильтровальной бумаги и сеточку затем окунают в жидкий этан. При быстром замораживании образуется стекловидный лед. С помощью специального охлаждаемого приспособления сеточку с образцом постоянно держат при температуре жидкого азота, благодаря чему становится возможным пря-

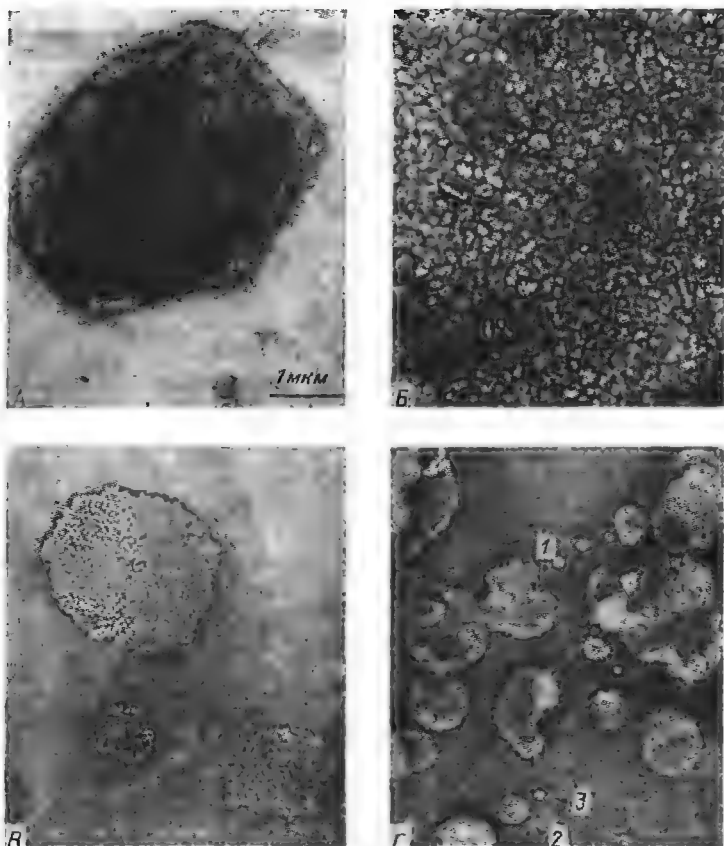


Рис. 5.3. Электронные микрофотографии ацетилхолинового рецептора. А. Нативная мембранная везикула из грубого гомогената электрического органа *Torpedo californica*. Ясно видны розетки ацетилхолинового рецептора. Б. Препарат, полученный из А сольбилизацией холатом натрия в присутствии липида (диолеонилфосфатидилхолина) и очищенный с помощью аффинной хроматографии на колонке с бромацетилхолином. Розетки ацетилхолинового рецептора имеют вид димеров, мономеров и олигомеров. Увеличение такое же, как и в случае А. В. Препарат, полученный из Б диализом против буфера, не содержащего холата. Образуются незамкнутые бислойные мембранные фрагменты ($\varphi=218$). Увеличение такое же, как и для А. Г. Препарат, полученный из Б инкубацией с $\frac{2}{3}$ объема липидно-холатной суспензии (60 мг/мл азолектина, 4% холата) с последующим диализом против буфера, не содержащего холата. Везикулы обладают хорошими транспортными характеристиками по отношению к ионам ($\varphi=10\,000$). Различимы димеры и мономеры (1) при виде сбоку. Везикула 2 — безбелковая липосома. Структура 3 идентифицирована как мицелла, поскольку ее диаметр меньше предельного размера (24 нм) для бислойных везикул. Увеличение такое же, как и в случае А. Все препараты для электронной микроскопии приготовлены нанесением 25—250 нг белка на медную сеточку, покрытую парлодием с напыленным углеродом, тщательно промыты буфером или 1%-ным уранилацетатом и затем контрастированы 1%-ным уранилацетатом. Образцы исследовали на электронном микроскопе Филлипс EM 400 при напряжении 100 кВ.

мое визуальное исследование биологического материала под электронным микроскопом. При этом методе исключены артефакты, вызываемые контрастированием и дегидратацией образца, а сам объект исследуется в подходящем для него ионном окружении.

3.2.2. Гель-фильтрация и другие методы

Размеры и степень гомогенности реконструированных везикул часто можно определить с помощью гель-хроматографии, используя крупнопористые носители. Хроматографические колонки можно откалибровать по латексным частицам стандартных размеров. Имеются данные, что размеры липосом, определенные с помощью электронной микроскопии и гель-фильтрации на калиброванных колонках, хорошо согласуются между собой [8]. Метод калиброванных колонок обладает тем преимуществом, что он позволяет очень просто найти распределение белка по везикулам разных размеров. Основной же его недостаток состоит в длительности элюирования (до нескольких суток). Кроме того, есть опасность, что из-за контакта с гелем может измениться характер распределения везикул по размерам, а также произойти адсорбция анализируемых веществ на колонке.

Реконструированные везикулы можно охарактеризовать и с помощью центрифугирования [70]. Фонг и Мак-Нэми [71] проводили центрифугирование реконструированного АцХР в градиенте плотности сахарозы, чтобы установить наличие мембранных фракций с разным содержанием белка. Если до центрифугирования образец подвергали замораживанию — оттаиванию, то эти фракции, по-видимому, сливались, давая один большой пик. Однако, судя по данным электронной микроскопии, популяция везикул оставалась более гетерогенной, чем это следовало из результатов градиентного центрифугирования (J. Eapenst, неопубликованные данные).

3.3. Факторы, определяющие морфологию реконструированных мембран

Размеры и форму реконструированных мембранных везикул часто бывает необходимо знать при измерениях функциональной активности интегральных мембранных белков. Например, активность ионных каналов обычно определяют по эффективности захвата радиоактивно меченных ионов замкнутыми реконструированными везикулами. Полезно помнить, что везикула диаметром 25 нм (именно такие везикулы обычно образуются при холатном диализе) имеет внутренний объем $2 \cdot 10^{-18}$ мл и будет

содержать всего одну молекулу растворенного вещества при его концентрации 1 мМ [72]. Поэтому даже если реконструированные мембраны имеют каналы, позволяющие ионам проникать в везикулы, из-за малого внутреннего объема последних могут возникнуть затруднения при измерении функциональной активности белка. Другой важной характеристикой реконструированных мембран является ориентация белка в бислое. Часто бывает трудно количественно оценить активность белка в реконструированной системе, если его ориентация в мембране точно не установлена и если не гарантирована целостность везикулярного бислоя. Этим характеристикам реконструированных мембран всегда нужно уделять самое серьезное внимание (см. ниже).

3.3.1. Отношение липид/белок

Как известно, *in vivo* некоторые мембраны существуют в виде замкнутых везикул даже при низком отношении липид/белок; в то же время в случае реконструированных мембран это невозможно. Например, АцХР-содержащие мембраны из электрических пластинок *Torpedo californica* можно выделить в виде крупных (400 нм в диаметре) замкнутых везикул, имеющих мольное отношение липид/белок (ϕ) около 300. Однако реконструированные АцХР-мембраны с отношением $\phi=300$ представляют собой преимущественно незамкнутые бислойные фрагменты, для которых не удастся измерить внутренний объем (J. Eapenst, неопубликованные данные). Молекулярные основы такого явления неясны; возможно, в стабилизации нативной мембраны участвуют цитоскелетные структуры, отсутствующие в реконструированных системах. Большинство исследований по реконструкции мембранных белков, функционирование которых сопровождается захватом ионов, были наиболее успешными при $\phi=8000-12\,000$. Впрочем, остается неясно, для чего необходим избыток липидов — для обеспечения непроницаемости мембраны или для формирования везикул максимального размера.

3.3.2. Тип детергента

Размер везикул может зависеть от типа детергента, присутствующего в смешанных белково-липидно-детергентных мицеллах. Например, мицеллы, содержащие холат, яичный фосфатидилхолин и гликофорин, образуют везикулы диаметром 25 нм с внутренним объемом $2 \cdot 10^{-18}$ мл, хотя идентичные во всех отношениях мицеллы, содержащие октилглюкозид вместо холата, образуют везикулы диаметром 230 нм с внутренним объемом $5 \cdot 10^{-15}$ мл [72]. Эти исследования показали также, что морфология везикул зависит и от исходного соотношения детергент/

/липид: при мольном отношении октилглюкозид/фосфатидилхолин 15:1 получают более крупные и более гомогенные везикулы, чем при отношении 5:1. С другой стороны, показано, что исходное отношение детергент/липид может неблагоприятно сказаться на функциях реконструируемого белка. Например, когда отношение детергент/липид настолько высоко, что происходит вытеснение детергентом аннулярных липидов, многие мембранные белки необратимо инактивируются [33—35] (см. также разд. 2.3.2.).

От типа детергента, формирующего смешанные мицеллы, могут зависеть и другие особенности реконструкции. Реконструкция методом холатного диализа с использованием диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) и АцХР в соотношении $\varphi=200$ приводит к образованию незамкнутых фрагментов липидного бислоя (размером 200 нм), в который внедрены плотно упакованные молекулы рецептора. При замене холата на октилглюкозид получают осадок агрегированного АцХР и липосомы, не содержащие белок (J. Earnest, неопубликованные данные).

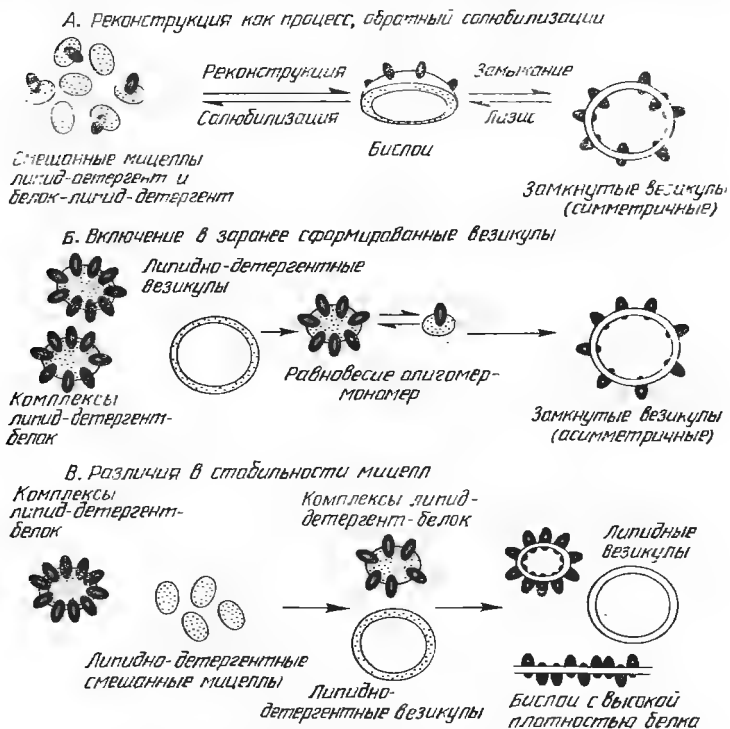


Рис. 5.4. Различные способы реконструкции мембран из солюбилизованных компонентов при удалении детергента (по данным обзора [59]).

3.3.3. Тип липида

Функциональная активность многих мембранных белков зависит от липидного состава их окружения [32]. Включение белка при реконструкции в определенное липидное окружение позволяет изучить специфическое влияние липидов на функцию этого белка. Однако такие исследования необходимо подкреплять тщательной характеристикой морфологии мембран, поскольку даже незначительные изменения липидного состава могут сильно изменить структуру реконструируемой мембраны. Ранние исследования по реконструкции АцХР показали, например, что этот белок легко включается в азолектиновые везикулы при холатном диализе, но когда в качестве липида был использован фосфатидилхолин, АцХР агрегировал, образуя цепи или кольца и не включаясь при этом в липосомы [73]. Более того, АцХР включался в везикулы, приготовленные (также путем холатного диализа) из суммарных липидов рецепторных мембран, но осаждался без включения в везикулы, если последние были приготовлены из липидов, лишенных холестерина [71]. Замена диэланодоилфосфатидилхолина (ДЭФХ, содержащий кислоту $C_{18:1}$ с *транс*-двойной связью) на ДОФХ (ФХ, содержащий кислоту $C_{18:1}$ с *цис*-двойной связью) приводит к изменению морфологии реконструированных мембран от плоских бислойных фрагментов с равномерным распределением включенных молекул АцХР до искривленных, напоминающих зонтик бислоев, в которых молекулы АцХР расположены только по периферии. Если реконструированные мембраны не просматривать под электронным микроскопом, то влияние липида на морфологию мембраны можно неверно истолковать как его специфическое воздействие на функцию белка.

Процесс реконструкции родопсина методом октилглюкозидного диализа тоже зависит от липидного состава и от отношения липид/белок [55]. Делипидизированный родопсин (26 мкМ) в октилглюкозиде (200 мМ) смешивали с фосфолипидами при $\varphi=300$. Эксперименты проводили с яичным ФХ, ДОФХ, ДМФХ, ПОФХ и липидами фоторецепторных дисков. Почти во всех случаях конечное отношение липид/белок после удаления детергента составляло 30—50, несмотря на то что исходно оно было равно 300. Исключение составляли только случаи с ДМФХ. ДМФХ в отличие от других липидов имеет короткие и насыщенные ацильные цепи. Как полагают авторы, смешанные мицеллы октилглюкозида со всеми фосфолипидами, кроме ДМФХ, менее стабильны, чем мицеллы из смеси октилглюкозид — фосфолипид — родопсин. Поэтому уже на ранних стадиях диализа из-за избытка липида образуются везикулы, не содержащие

белка. Белоксодержащие мицеллы, существенно не различающиеся по отношению липид/белок, формируют везикулы на поздних стадиях диализа (рис. 5.4, В).

3.3.4. Метод удаления детергента

Очень важной при реконструкции может оказаться скорость, с которой удаляется детергент [74, 75], поскольку функциональная активность некоторых мембранных белков изменяется при длительном воздействии детергента. Скорость удаления детергента может сказываться и на структуре реконструированных мембран. Если при реконструкции АцХР с азолектином, ДОФХ или ДЭФХ при $\varphi = 10\,000$ холат удаляют диализом в течение 4 сут, то формируются весьма разнообразные структуры. Азолектин при этом образует мономеллярные везикулы, в которые равномерно включен АцХР. ДОФХ образует везикулы, не содержащие АцХР, сам же АцХР находится в растворе в виде агрегатов; из ДЭФХ формируются крупные «зонтики» с молекулами АцХР по краям. Если же холат быстро удаляют методом разбавления [76] или гель-фильтрацией [73], все три липида образуют мономеллярные везикулы с АцХР, включенным в бислой. Конечно, проводя систематическое изучение факторов, влияющих на реконструкцию, исследователь прежде всего ставит задачу успешно реконструировать функцию изучаемого мембранного белка. Однако при этом необходимо помнить, что функциональную активность белка не удастся обнаружить, если реконструированная мембрана имеет неподходящую для проявления этой функции морфологию.

3.3.5. Влияние замораживания — оттаивания

Как известно, липидные везикулы самопроизвольно сливаются при температурах ниже температуры их фазового перехода [66]. Способность везикул к слиянию была использована при реконструкции АцХР, чтобы получить более крупные везикулы, которые должны давать более сильный функциональный отклик при измерении транспортной активности, чем исходные везикулы. Анхольт и др. [39] показали, что размер везикул при замораживании — оттаивании увеличивается только тогда, когда в азолектиновые везикулы, содержащие АцХР, включали еще и холестерол. До замораживания — оттаивания лишь 3% везикул имели диаметр более 100 нм, но после этой обработки их доля возросла до 24%. Однако в другом исследовании, где также меняли липидный состав, было показано, что возрастание внутреннего объема, наблюдаемое в случае везикул, подвергшихся замораживанию, не коррелирует с содержанием холес-

терола [77]. Общей проблемой, с которой сталкиваются при реконструкции, является гетерогенность везикул. При включении АцХР методом холатного диализа в липидные смеси разного состава были получены две фракции везикул, разделяемые в градиенте сахарозы, одна из которых состояла только из липидов [71]. После нескольких циклов замораживания — оттаивания два пика, отвечающие этим двум фракциям, слились в один, расположенный в области промежуточной плотности раствора сахарозы. Этот препарат хорошо захватывал радиоактивные катионы и использовался для измерений ионного транспорта, однако неясно, с чем было связано кажущееся увеличение функциональной активности: с ростом внутреннего объема везикул, с «герметизацией» мембраны или с действием каких-либо других факторов. Электронные микрофотографии с негативным контрастированием препаратов мембран, содержащих АцХР, после процедуры замораживания — оттаивания свидетельствуют о поразительной гетерогенности препаратов и заметном возрастании содержания в них многослойных везикул [10]. Имеются также данные, основанные на результатах электронной микроскопии замороженных сколов, о том, что замораживание — оттаивание мембран может привести к захвату некоторых белков везикулами, а не к включению их в липидный бислой [10]. Если замораживание необходимо для длительного хранения везикул, то можно добавить сахарозу, чтобы предотвратить образование многослойных везикул при оттаивании [78].

3.4. Характеристика реконструированных везикул

3.4.1. Измерение внутреннего объема

Простой метод определения объема водной фазы, включенной внутрь реконструированных везикул или липосом, состоит в проведении реконструкции в присутствии 0,1 М хромата натрия или калия. Не вошедший в везикулы хромат удаляют гель-фильтрацией, а хромат, захваченный везикулами, высвобождают солиubilизацией аликвоты в 10 мМ тритоне X-100 и затем определяют его концентрацию по поглощению света при 380 нм. Чтобы найти удельный внутренний объем, выраженный в литрах на моль липида, концентрацию хромата в аликвоте относят к общей концентрации хромата и липида в образце [62].

В качестве других индикаторов при определении внутреннего водного объема используют 0,1 мМ 6-карбоксифлуоресцеин, концентрацию которого определяют по его флуоресценции [62], или радиоактивные сахара, такие, как [^{14}C]-лактоза [79] или [^3H]-декстран [80], содержание которых измеряют с помощью сцинтилляционного счетчика. Следует удостовериться,

что индикатор не действует на функциональную активность реконструируемого белка и не влияет на ход самой реконструкции.

Определение внутреннего объема облегчается, если мембрана содержит белки, проявляющие свойства ионного канала, типа АцХР и натриевого канала. Везикулы инкубируют в течение ночи с радиоактивными ионами, проникающими через канал; не вошедшие ионы удаляют с помощью ионообменной колонки [37, 81] и измеряют радиоактивность ионов, захваченных везикулами.

3.4.2. Измерение проницаемости везикул

Данные по проницаемости везикул особенно важны, когда необходимо установить трансмембранную ориентацию белка в бислое или измерить его транспортные характеристики. Вандер-Штеен и др. [80] тщательно изучили влияние гликофорина на проницаемость диолеилфосфатидилхолиновых везикул, одновременно измеряя в них содержание захваченного [^3H]-декстрана и калия. Методика состоит в следующем.

1. Готовят везикулы в присутствии 0,2%-ного (в/о) [^3H]-декстрана.

2. Удаляют не проникший в везикулы декстран хроматографией на сефарозе CL-4В.

3. Везикулы, вышедшие в свободном объеме колонки, осаждают центрифугированием в течение 1 ч при 100 000 g, затем наносят их на колонку с сефадексом G-50, уравновешенную раствором холинхлорида, чтобы удалить не вошедшие в везикулы ионы K^+ .

4. Выход ионов K^+ из везикул регистрируют с помощью калиевого электрода, а внутренний объем определяют по радиоактивности декстрана.

Полагая, что выход K^+ из везикул следует кинетике первого порядка, по изменению содержания ионов K^+ во внешнем растворе можно определить характерное время транспорта калия.

3.4.3. Определение трансмембранной ориентации белка

Наиболее распространенный метод определения ориентации белка в мембране заключается в измерении его функциональной активности в присутствии и в отсутствие солюбилизирующего детергента. Некоторые мембранные белки имеют специфические участки, расположенные на наружной поверхности везикул, связывающие с высоким сродством радиоактивные лиганды или токсины. Везикулы, связавшие лиганд или токсин,

можно затем отделить от свободного токсина с помощью хроматографии на колонке или фильтрации через ионообменные фильтры (см., например, [81, 82]). Если связывание специфично и не зависит от присутствия детергента, то измеряя связывание до и после солюбилизации везикул, удастся определить долю белков, экспонированных на поверхности везикул.

Ферментативную активность можно измерять как в присутствии детергента, так и в его отсутствие, но следует тщательно отнестись к выбору детергента. Например, в случае оксидазы цитохрома *c* только твин 80 (3%, о/о) не влияет на ее ферментативную активность [83].

У многих мембранных белков внеклеточный домен гликозилирован. В этом случае ориентацию белка можно определить по доступности синаловой кислоты для нейраминидазы [78, 80, 84]. Везикулы, содержащие белок, обрабатывают нейраминидазой в присутствии и в отсутствие тритона X-100 и сравнивают количество высвободившейся синаловой кислоты. Недостатком этого метода является его неспецифичность: если реконструированный белок недостаточно хорошо очищен, то присутствие других гликозилированных белков может исказить результаты.

Для выяснения трансмембранной ориентации белка можно использовать моноклональные антитела, специфичные к его наружному или внутреннему домену. Анхольт и др. [85] использовали моноклональные антитела для иммунопреципитации ацетилхолиновых рецепторов, которые были предварительно помечены радиоактивным токсином. Ориентацию определяли по степени связывания моноклональных антител с рецептором в присутствии и в отсутствие 0,3%-ного (в/о) сапонина, под действием которого мембрана становится проницаемой [85].

Недостаток всех перечисленных выше методов связан с тем, что они могут давать завышенную оценку доли молекул, имеющих неупорядоченную ориентацию, если реконструированная мембрана проницаема для векторной метки в отсутствие детергента (или если мембрана не образует замкнутой везикулы). Аналогично интерпретация экспериментов по установлению ориентации белка в мембране может оказаться ошибочной, если белок не включается в мембрану, а проникает внутрь замкнутых везикул [80]. Эти проблемы можно решить, если тщательно измерять внутренний объем везикул и их проницаемость, а также проводить электронно-микроскопический контроль.

Имеются по меньшей мере два метода определения трансмембранной ориентации белков по данным электронной микроскопии, хотя эти методы, возможно, менее надежны, чем описанные выше биохимические подходы. Так, Саито и др. [87, 88] предложили фиксировать реконструированные везикулы с по-

мощью танининовой кислоты и осмия с последующей заливкой в смолу и получением тонких срезов. В проведенных ими экспериментах интенсивно прокрашивались только те белковые домены, которые в нативных мембранах находились на наружной поверхности. Появление интенсивно окрашенного слоя на внутренней поверхности везикул, по мнению авторов, свидетельствовало о том, что белок не имеет векторной ориентации. При использовании этого метода необходимо тщательно контролировать проницаемость мембраны в ходе прокрашивания и убедиться в асимметричном характере прокрашивания исследуемого белка.

Другой метод установления ориентации белка в реконструированных мембранах по данным электронной микроскопии основан на исследовании препаратов, приготовленных по методике замораживания — скалывания. Чен и Хаббелл [89] показали, что в нативной мембране родопсин всегда находится на поверхности скола, отвечающей наружной стороне бислоя, тогда как при реконструкции в фосфатидилхолиновых везикулах он обнаруживается в равной степени на обеих поверхностях скола. Эти исследователи предположили, что векторная ориентация белка, наблюдаемая *in vivo*, не воссоздается при реконструкции. Одинаковое распределение внутримембранных частиц на вогнутой и выпуклой поверхностях скола послужило основанием для вывода о том, что родопсин в яичном фосфатидилхолине не имеет векторной ориентации [55]. Следует, однако, проявлять осторожность, применяя этот подход для других белков и даже для родопсина, если условия реконструкции меняются. Многие из тех белков, которые заведомо векторно ориентированы в мембране эритроцитов, на поверхностях скола выглядят как хаотично распределенные. К тому же изменения состава бислоя, гликозилирование или белок-белковые взаимодействия могут привести к изменению характера распределения между поверхностями скола (K. Fisher, личное сообщение).

Наконец, следует отметить, что при многих функциональных исследованиях мембранных белков нет необходимости в том, чтобы все молекулы исследуемого белка были экспонированы на наружной поверхности мембраны. Например, в случае ацетилхолинового рецептора ионный канал открывается при связывании агониста с наружным доменом белка, так что поток ионов наблюдается только через те каналы, которые ориентированы соответствующим образом [47].

3.4.4. Факторы, определяющие трансмембранную ориентацию белка

In vivo мембранные белки почти всегда имеют строго определенную векторную ориентацию, однако при реконструкции они часто оказываются ориентированными в бислой хаотически.

Известно, что на ориентацию белка при реконструкции влияет ряд факторов, но на основании этих наблюдений пока трудно сделать какие-либо обобщающие выводы.

Например, было показано, что поверхностный белок M13 включается в димиристоилфосфатидилхолиновые везикулы так, что на наружной поверхности бислоя находится только N-конец молекулы. Однако, если реконструкцию проводить при температуре фазового перехода димиристоилфосфатидилхолина, на наружной поверхности оказываются как N-, так и C-конец [90]. Ориентация может зависеть также от отношения липид/белок: при $\varphi > 88$ Ca²⁺-АТРаза саркоплазматического ретикулума, реконструированная в везикулах из липидов саркоплазматического ретикулума, имеет вполне определенную ориентацию, тогда как при $\varphi < 88$ этот белок ориентирован хаотически [88].

Гликофорин при реконструкции в фосфатидилхолиновых везикулах ориентируется на 50—75% внешним доменом наружу [72, 80]. Однако при низких отношениях липид/белок ($\varphi = 300$) около 30% гликофорина не встраивается в бислой, а захватывается везикулами [80]. Захваченный везикулами гликофорин (а это наблюдается и в случае реконструированного ацетилхолинового рецептора после замораживания — оттаивания; J. Eapenest, неопубликованные данные) может ошибочно восприниматься как белок, не имеющий векторной ориентации. Этот пример говорит о том, что при установлении трансмембранной ориентации белка необходимо применять несколько методов, а для контроля за реконструкцией целесообразно использовать электронную микроскопию.

На трансмембранной ориентации белков и липидов может сказываться также их агрегация при реконструкции. Было показано, что молекулы белка, образующего выступы на поверхности мембраны вируса леса Семлики, в зависимости от концентрации октилглюкозида могут находиться в мономерном либо олигомерном состоянии [59]. Если при реконструкции с яичным фосфатидилхолином белок находится в олигомерной форме, то 95% его молекул оказываются экспонированными на наружной поверхности везикул, тогда как при реконструкции белка в мономерной форме доля молекул, имеющих наружную ориентацию, составляет всего 70%. Гипотеза, объясняющая эти наблюдения на молекулярном уровне, представлена на рис. 5.4, А и Б. Результаты этих экспериментов, как и данные Кэрролла и Рэкера [83], показывают, что если необходимо добиться векторной ориентации белка при реконструкции, то лучше всего включать его в заранее сформированные везикулы.

При тех соотношениях липид/белок, которые способны формированию замкнутых везикул (в области $\varphi = 1000$), от 75 [85] до 95% [77] молекул реконструированного ацетилхоли-

Таблица 5.8. Включение ацетилхолинового рецептора в липидные везикулы

1. Суспендируют 600 мг азолектина¹⁾ в 10 мл буфера БД-1. Обработывают суспензию при комнатной температуре ультразвуком до получения достаточно однородной суспензии (10—30 мин). Добавляют холат натрия в виде порошка (0,4 г) до концентрации 4% и снова обрабатывают ультразвуком до тех пор, пока раствор не станет прозрачным (10 мин).
2. Если необходимо, буфером БД-3 (табл. 5.6) доводят раствор очищенного ацетилхолинового рецептора до концентрации по белку 1,5 мг/мл. (В зависимости от числа собранных фракций концентрация белка может быть меньше, но не ниже 1 мг/мл.)
3. К двум объемам препарата очищенного ацетилхолинового рецептора добавляяют один объем смеси азолектин—холат, приготовленной на стадии 1. Конечные концентрации компонентов должны приблизительно составлять: 2% для холата, 20 мг/мл для липида и 1 мг/мл для ацетилхолинового рецептора, что отвечает мольному отношению липид/белок, равному 6700/1.
4. Диализуют суспензию против 4 л буфера БД-1 в течение по крайней мере 48 ч с тремя сменами буфера. Используют диализные трубки Spectra-Pore, предварительно вымоченные в буфере БД-1, содержащем 1%-ный холат.
5. Полученные при диализе мембранные препараты можно хранить не менее 2 нед при 4°C без заметной потери функциональной активности. Их можно также хранить замороженными в жидком азоте. Однако замораживание — оттаивание приведет к изменению размера и степени гомогенности везикул.

¹⁾ Фирма Associated Concentrates, Woodside, N Y.

нового рецептора ориентируются так, что их наружный домен находится на поверхности везикул независимо от условий реконструкции. Напротив, натриевый канал, имеющий такие же размеры, как и ацетилхолиновый рецептор, по-видимому, ориентирован хаотически в реконструированных системах; об этом свидетельствуют все проведенные до сих пор исследования [91]. Еще один интегральный мембранный белок, который, по-видимому, ориентируется в реконструированных мембранах хаотично, — это бактериородопсин [63, 89]. На трансмембранную ориентацию белка может влиять и его пространственная конфигурация. Например, ацетилхолиновый рецептор имеет крайне асимметричную воронкообразную форму [92]; возможно, этим и объясняется его четко выраженная склонность к векторной трансмембранной ориентации в отличие от бактериородопсина, имеющего бочкообразную форму [68].

3.5. Реконструкция ацетилхолинового рецептора

В табл. 5.8 последовательно описана методика, которая успешно применялась для приготовления реконструированных мембран, содержащих функционально активный ацетилхолиновый рецептор электрического органа *Torpedo*. Детергент удаляли диализом, что позволило получить везикулы, пригодные для измерения ионных потоков. Аналогичную методику можно использовать и для других мембранных белков.

4. Определение функциональной активности реконструированных мембран

Основная задача реконструкции состоит в том, чтобы создать для мембранных белков такое окружение, которое позволило бы измерить и охарактеризовать их функциональную активность. Многие методы эффективной солиubilизации и реконструкции, описанные в предыдущих разделах, преследуют цель сохранить функциональную целостность мембранных белков и максимально облегчить определение их активности с помощью традиционных аналитических методик. В этом разделе мы рассмотрим ряд общих методов биохимического анализа мембранных белков как в солиubilизированном, так и в реконструированном состоянии.

Чаще всего этот анализ основан на определении связывания лигандов, измерении ферментативной активности и определении транспортных характеристик или проницаемости. В некоторых реконструированных системах удастся также показать наличие функционального сопряжения между различными белками.

4.1. Определение связывания и ферментативной активности

Как правило, эти измерения можно проводить на всех стадиях очистки, поскольку методы анализа обычно применимы к белку в нативном окружении, белку в солиubilизированном состоянии и к реконструированному белку. Многие теоретические и практические вопросы определения ферментативной активности и связывания лигандов одинаковы как для белков, находящихся в растворе, так и для белков, связанных с мембранами, и поэтому мы не будем останавливаться на них подробно. Например, в обоих случаях необходимо убедиться в том, что связывание происходит в условиях насыщения, является избирательным, стереоспецифичным, обратимым и ингибируемым. Однако в случае мембранных белков есть целый ряд уникальных проблем, которые заслуживают специального рассмотрения.

В условиях солиubilизации детергент может повлиять на эффективную концентрацию субстрата или лиганда, доступного для белка. Например, если субстрат является амфифильным веществом, то он может накапливаться в мицеллах детергента, что затруднит его взаимодействие с активным центром фермента. Под влиянием детергента может измениться конформация белковой молекулы и тем самым свойства белка как фермента. Возможно также, что детергент «обнажит» активные центры фермента или участки аллостерического взаимодействия, кото-

Таблица 5.9. Методы, применяемые для анализа связывания лигандов солюбилизованными белками

Метод	Пояснения
Гель-фильтрация	Процедура занимает много времени. Неприменима для большого числа образцов. Детергент может повлиять на разделение.
Фильтрация	Быстрый метод. Позволяет анализировать много образцов. Непригоден при быстрой диссоциации лиганда ($t < 15$ с). Имеется широкий спектр различных фильтров.
Ультрацентрифугирование	Процедура занимает много времени. Можно анализировать только ограниченное число образцов. Возможен захват несвязанного лиганда (однако центрифугированием через слой масла можно снизить его до минимального уровня; см. Приложение IV).
Равновесный диализ	Занимает очень много времени. Позволяет проводить измерения в условиях равновесия.
Проточный диализ	Быстрый метод. Позволяет изменять концентрацию лиганда в одном образце в широких пределах. Затруднения обычно вызывает неспецифическое связывание лиганда.
Осаждение полиэтил- енгликолем	Быстрый метод. Позволяет использовать фильтрование или центрифугирование.
Иммунологические ме- тоды	Необходимы специфичные антитела.

рые были экранированы, когда белок находился в мембранном окружении. Все это означает, что на практике необходимо выбирать такой метод анализа, который гарантировал бы достоверные измерения полной активности изучаемого белка. Для фермента в составе мембраны и в солюбилизованном состоянии необходимо измерить как K_m , так и V_{max} . В случае белков, для которых можно измерить только связывание, следует определить K_d и общее число центров связывания; обычно это делают с помощью графика Скэтчарда. Обнаруживаемые при этом различия могут быть либо артефактом, связанным с изменением доступности субстрата для белка в составе мембраны или в солюбилизованном состоянии, либо свидетельством интересных изменений свойств самого белка.

Анализ мембраносвязанных белков облегчается благодаря по крайней мере одному обстоятельству. При определении активности белка по связыванию в отличие от методов определения ферментативной активности в большинстве случаев требуется отделить свободный лиганд от связанного с помощью какого-либо физического метода. В случае мембран такое разделение обычно удается легко осуществить с помощью центрифуги-

гирования или фильтрования через стекловолокнистые фильтры с определенным размером пор. Конечно, при разделении может произойти нарушение равновесия, установившегося между лигандом и центром связывания, однако разделение происходит достаточно быстро, чтобы получить вполне приемлемые результаты. Использование микроцентрифуг, ультрацентрифуг с воздушным приводом и специальных многогнездовых фильтровальных устройств позволяет анализировать большое число образцов. В некоторых случаях метод фильтрования может оказаться пригодным и для солюбилизованных белков. Основная проблема при анализе связывания методом фильтрования состоит в том, что промывание фильтра, необходимое для снижения фонового уровня несвязавшегося лиганда, часто приводит к вымыванию связанного лиганда, если он не обладает высоким сродством к белку (т. е. при $K_d = 10^{-7}$ М или меньше). Ниже мы рассмотрим несколько примеров анализа белков по связыванию и по их ферментативной активности, с тем чтобы ознакомить читателя с практически используемыми методиками (см. также работу [93]). В табл. 5.9 суммированы методы отделения свободного лиганда от связанного, обычно применяющиеся для мембраносвязанных и солюбилизованных белков, а в Приложении III детально описан метод, основанный на использовании масляных слоев, о котором ранее не сообщалось.

4.1.1. Ацетилхолиновый рецептор

Ацетилхолиновый рецептор специфично связывает α -бунгаротоксин — положительно заряженный белок змеиного яда — с высоким сродством ($K_d = 10^{-11}$ М). Имеются также производные токсина, меченные радиоактивным иодом. Если избыток радиоактивного токсина проинкубировать с ацетилхолиновым рецептором в детергентном растворе в течение 30—60 мин при комнатной температуре [обычно берут 50 мкл раствора, содержащего тритон X-100 (0,2%), токсин (30 нМ) и ацетилхолиновый рецептор (5 нМ)], то комплекс рецептора с токсином удастся легко отделить от несвязавшегося токсина пропусканием смеси через ДЭАЭ-целлюлозный фильтр. Положительно заряженный фильтр задерживает комплекс, несущий отрицательный заряд, и пропускает несвязавшийся с рецептором токсин. Благодаря очень прочному связыванию токсина с ацетилхолиновым рецептором можно тщательно отмыть фильтр от несвязавшейся метки [47, 81, 94]. Поскольку этот метод анализа основан на принципах ионного обмена, необходимо использовать неионные детергенты (такие, как тритон X-100). Можно проводить анализ, сначала инкубируя мембраны с соответствующими лигандами, а затем растворяя их в детергенте перед

фильтрованием. Поставидийное описание этой методики приведено в табл. 5.10.

Кажущееся значение K_d низкомолекулярных активирующих лигандов можно определить описанным выше методом по их способности конкурировать с токсином за места связывания. Этот подход был использован также для того, чтобы показать изменения во времени сродства ацетилхолинового рецептора к активирующим лигандам, таким, как карбамилхолин. Предварительная инкубация ацетилхолинового рецептора с карбамилхолином переводит рецептор в высокоаффинное состояние [95], которое можно отличить от состояния связывания покоящегося рецептора, измеряя *скорость* связывания токсина. Переход из низкоаффинного состояния в высокоаффинное характерен для ацетилхолинового рецептора, функционирующего в мембранном окружении, и является необходимой предпосылкой активации ионного канала. Таким образом, анализируя связывание, можно эффективно оценивать успешность проведения реконструкции. Интересно, что в случае солюбилизованного ацетилхолинового рецептора переход из низкоаффинного состояния в высокоаффинное не наблюдается, поэтому связывание следует определять в отсутствие детергента. Отделение мембран от несвязавшегося токсина можно проводить центрифугированием, однако метод фильтрования более прост и более пригоден для анализа большого числа образцов. Данные по конкурентному связыванию довольно хорошо согласуются с результатами, полученными при прямых измерениях связывания радиоактивно меченного ацетилхолина и карбамилхолина [42].

При прямых измерениях связывания низкомолекулярных активирующих лигандов с использованием меченных тритием ацетилхолина и карбамилхолина необходимо строго соблюдать условия фильтрования, чтобы избежать разброса данных из-за быстрой диссоциации обратимо связанного лиганда. С этой целью рекомендовано использовать стекловолоконистые фильтры (ватман GF/F) и точно выдерживать время фильтрования под вакуумом [42]. Поправку на захват изотопа и неспецифическое связывание определяли после предварительной инкубации образцов с избытком немеченого токсина. Серьезную проблему при определении связывания представлял разброс по удельной радиоактивности различных партий меченого лиганда. Истинные значения были получены после очистки ацетилхолина электрофорезом и разбавления его немеченым лигандом перед измерением удельной радиоактивности. Во всех случаях измеренные величины значительно отличались от тех, которые были указаны поставщиком [42].

Другой подход, который оказался успешным в ряде случаев, основан на введении в белок спиновой или флуоресцентной мет-

Таблица 5.10. Исследование связывания токсина с ацетилхолиновым рецептором

Принцип

Ацетилхолиновый рецептор, солюбилизованный детергентом, инкубируют с избытком радиоактивно меченного α -бунгаротоксина при 4 °C в течение 30—60 мин для того, чтобы занять все доступные места связывания. Комплекс рецептор—токсин отделяют от несвязавшегося токсина фильтрованием смеси через ДЭАЭ-фильтры. Токсин заряжен положительно и потому не связывается с фильтром, тогда как отрицательно заряженный комплекс адсорбируется на фильтре (при низкой ионной силе).

Буферы

NMT-100: 100 мМ NaCl
10 мМ MOPS
0,2%-ный тритон X-100
рН 7,4

NMT-10: 10 мМ NaCl
10 мМ MOPS
0,2%-ный тритон X-100
рН 7,4

Токсины

Радиоактивно меченный токсин: [^{125}I]- α -бунгаротоксин (2—4 мкМ) в буфере, содержащем 5 мМ фосфат натрия, рН 6,5, и 1 мг/мл BSA; (1—2) $\cdot 10^5$ расп./мин на 1 пмоль. Поставляется фирмами NEN и Amersham.

Немеченый токсин: 20 мкМ α -бунгаротоксин в буфере NMT-100.

Методика анализа

1. Разбавляют ацетилхолиновый рецептор буфером NMT-100 так, чтобы в 50 мкл содержалось 2—3 пмоль центров связывания (40—60 нМ). Для анализа каждого образца требуется четыре аликвоты по 50 мкл.
2. Вносят аликвоты по 50 мкл в четыре пластиковые пробирки (емкостью 10—15 мл). Две пробирки служат контролем (их содержимое обрабатывают немеченым токсином для введения поправки на неспецифическое связывание), а две другие используются для определения полного связывания.
3. В контрольные пробирки добавляют по 15 мкл раствора немеченого токсина, а в две другие — по 15 мкл буфера NMT-100. Оставляют все пробирки при комнатной температуре на 20 мин. Для каждого аналитического комплекта готовят еще две фоновые пробирки, чтобы определить неспецифическое связывание токсина с фильтрами в отсутствие ацетилхолинового рецептора. В каждую из этих пробирок вносят по 65 мкл буфера NMT-100.
4. Разбавляют радиоактивно меченный токсин буфером NMT-100 до концентрации 150 нМ. Для каждого образца требуется 4 $\times$ 50 мкл. Еще 200 мкл необходимы в качестве внутреннего стандарта для определения неспецифического связывания на фильтре.
5. Добавляют по 50 мкл разбавленного раствора радиоактивно меченного токсина в каждую пробирку. Инкубируют 45 мин при комнатной температуре.
6. Помещают по два фильтра ватман DE-81 на каждый держатель вакуумной фильтровальной установки. Промывают фильтры 4 мл буфера NMT-10 при низком вакууме. (Хорошо зарекомендовала себя установка Hoefer с фильтрами диаметром 24 мм, но в принципе годится любая фильтровальная установка.)
7. Разбавляют каждый образец 5 мл буфера NMT-10 и сразу же наносят его на фильтр, подводя фильтрование при слабом отсасывании. Наполняют пробирку буфером NMT-10 и промывают фильтр. Повторяют промывку. Снимают почти сухие фильтры пинцетом и помещают их в пластиковые пробирки.
8. Определяют радиоактивность сухих фильтров на гамма-счетчике в условиях, оптимальных для детектирования ^{125}I .
9. Для приготовления внутреннего стандарта берут два фильтра и наносят прямо на них по 50 мкл раствора меченого токсина.

С помощью внутреннего стандарта можно рассчитать удельную радиоактивность токсина в имп./мин на 1 пмоль токсина. Число пикомолей связавшегося токсина в каждом образце можно определить путем вычитания числа импульсов за счет неспецифического связывания из суммарного числа импульсов.

Специфичность связывания в данном случае настолько высока, что степень неспецифического связывания близка к нулю даже для очень разбавленных препаратов рецептора. Контрольные пробирки и пробирки для определения фона дают фактически одинаковые значения. На практике нет необходимости проводить по два контрольных определения для каждого образца. Обычно берется только один набор контрольных образцов для всего комплекта образцов, анализируемых за один прием.

ки. Если метка чувствительна к связыванию белка с лигандом, то это дает возможность непрерывно регистрировать процесс связывания во времени. Шанже и др. [96] использовали флуоресцентные аналоги ацетилхолина для измерения его связывания с ацетилхолиновым рецептором как в нативных, так и реконструированных мембранах с очень хорошим временным разрешением. Они обнаружили переход из низкоаффинного состояния в высокоаффинное и получили данные о том, что низкоаффинное состояние отвечает неактивированному ацетилхолиновому рецептору. Рафтери и др. [97] использовали различные метки, ковалентно связанные с ацетилхолиновым рецептором, как косвенные датчики на связывание ацетилхолина. Они показали, что новые места связывания по своим характеристикам отличаются от двух известных высокоаффинных центров.

4.1.2. β -Адренэргический рецептор

Регуляция активности аденилатциклазы при участии β -адренэргического рецептора происходит благодаря взаимодействию в мембране трех разных белков: самого рецептора, G_s -белка и аденилатциклазы. G_s -белок представляет собой олигомерный белок, который связывает GTP (и его аналоги) и стимулирует аденилатциклазу. Негидролизующие аналоги GTP вызывают стойкую активацию аденилатциклазы. β -Адренэргический рецептор (как и другие рецепторы гормонов) влияет на активность G_s -белка и через него регулирует активность аденилатциклазы [98, 99]. Методы солюбилизации, очистки и реконструкции белков сыграли решающую роль в идентификации и характеристике основных компонентов этой сложной системы [93]. Общая методика включает по меньшей мере пять функциональных тестов:

- 1) связывание лигандов, таких, как [3H]-дигидроалprenолол (агонист) или [^{125}I]-нодгидроксibenзилпиндолол (антагонист), с β -адренэргическим рецептором;

- 2) связывание GTP или его негидролизующего аналога с G_s -белком;

- 3) активация G_s -белка, определяемая по его способности стимулировать аденилатциклазную активность;

- 4) GTP-азная активность G_s -белка;
- 5) сама аденилатциклазная активность.

Ряд исследователей изучали различные проблемы регуляции аденилатциклазы как в нефракционированной ферментной смеси, так и после ее разделения [100—104]. Росс и др. [100, 101] сконцентрировали свои усилия на изучении взаимодействия между β -адренэргическим рецептором из эритроцитов индейки с G_s -белком из печени кролика, приводящего к активации G_s -белка. Специальные эксперименты, проведенные с плазматическими мембранами клеток лимфомы, которые не содержат G_s -белка, показали, что экзогенный G_s -белок, находящийся в активированном состоянии (т. е. содержащий связанный GTP), способен стимулировать аденилатциклазу [105]. Задача состояла в том, чтобы по отдельности очистить рецептор и G_s -белок и затем встроить их в одни и те же липидные везикулы. Для удаления детергентов использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-50. Поскольку рецептор и G_s -белок были очищены разными методами и в полученные растворы были включены дополнительные липиды, окончательная солюбилизирующая смесь имела очень сложный состав и содержала четыре детергента: дигитонин, луброл, дезоксихолат и холат.

Детальный анализ этой работы позволяет увидеть некоторые проблемы, типичные для исследований мембранных белков. Например, луброл 12A9 — детергент, использованный для солюбилизации G_s -белка — ингибирует GTPазную активность, но не влияет на связывание GTP и его аналогов [101]. На основании результатов предыдущих исследований (проведенных с использованием луброла) был сделан ошибочный вывод, что GTPазная активность не имеет отношения к G_s -белку. В реконструированной системе после удаления детергента эта активность восстанавливается. Солюбилизация детергентом также приводит к нарушению связывания антагонистов (но не [3H]-дигидроалъпренолола) с рецептором. Полное восстановление связывающей активности происходит в реконструированной системе. Для определения связывания низкомолекулярных лигандов были использованы стеклянные фильтры (ватман GF/F), позволяющие быстро отделить комплекс между белком и лигандом от свободного лиганда [106].

4.1.3. Кальциевые каналы

При очистке потенциалзависимых кальциевых каналов из скелетной мышцы Куртис и Каттерол [107] столкнулись с двумя серьезными проблемами в дополнение к трудностям, связанным с низкой концентрацией этих каналов в ткани. Во-пер-

вых, поскольку активация канала происходит при изменении потенциала, для регистрации функциональной активности требуется интактная мембрана, на которой может быть создан стабильный трансмембранный потенциал. Как мы покажем в следующем разделе, трудно разрабатывать методику очистки мембранного белка, когда при рутинном анализе имеются такие жесткие ограничения условий реконструкции. Во-вторых, связывание специфических антагонистов, таких, как [^3H]-нитрендипин, после солюбилизации белка в детергенте (дигитонине) не удается зарегистрировать из-за очень сильного неспецифического связывания лиганда с детергентными мицеллами. Эту проблему удалось частично решить путем предварительной инкубации очищенных мембран с [^3H]-нитрендипином с последующим отмыванием неспецифически связавшейся метки и солюбилизацией и очисткой комплекса канал — лиганд. Выход меченого белка контролировали на всех стадиях очистки и удельную активность корректировали с учетом медленной диссоциации лиганда и комплекса.

4.2. Методы регистрации транспорта и проницаемости

Основная ценность методов реконструкции состоит в том, что они дают возможность в контролируемых условиях регистрировать транспортные функции мембраны или ее проницаемость. В тех случаях, когда транспорт требует наличия ионного градиента или мембранного потенциала, мембраны должны быть непроницаемыми, чтобы создать изолированные объемы, необходимые для осуществления векторных процессов. Один из самых изящных и принципиально важных экспериментов по реконструкции был проведен Рэкером и Стокениусом [108]. Они включили в одни и те же липидные везикулы бактериородопсин — светозависимый протонный насос, выделенный из пурпурных мембран клеток *Halobacterium halobium*, и АТРазный комплекс из митохондрий. Было показано, что свет может запускать синтез АТФ из АДФ в реконструированных везикулах. Поскольку единственная функциональная связь между этими двумя белками заключалась в создании протонного градиента и обусловленного им мембранного потенциала, этот эксперимент наглядно доказал значение протондвижущей силы в запуске синтеза АТФ.

Благодаря возможности измерять захват или высвобождение ионов, а также молекул из замкнутых реконструированных везикул последние широко используются для характеристики тех условий, которые абсолютно необходимы для функционирования ионных каналов или транспортных систем.

4.2.1. Ацетилхолиновый рецептор

Хорошо известно, что в случае ацетилхолинового рецептора связывание активирующих лигандов, таких, как ацетилхолин, сопровождается открыванием катионспецифичного ионного канала. Длительный контакт ацетилхолинового рецептора с активирующим лигандом приводит к обратимой инактивации канала. Этот процесс обычно называют десенситизацией рецептора. Многие ключевые вопросы, связанные с различными путями активации и инактивации рецептора, были выяснены на основании электрофизиологических исследований интактных рецепторов и изучения ионных потоков, проведенного на изолированных мембранах (см. обзоры [40, 57]). Реконструированные мембраны, содержащие очищенный ацетилхолиновый рецептор, дают возможность определить, сохраняет ли выделенный белок те функциональные характеристики, которые приписываются самому рецептору. Они позволяют также получить данные, более пригодные для количественного описания механизма регуляции ионной проницаемости ацетилхолинового рецептора. На рис. 5.5, 5.6 и 5.7 схематически представлены две методики регистрации ионной проницаемости, которые используются в настоящее время для изучения функциональной активности мембран, содержащих ацетилхолиновый рецептор, а в табл. 5.11 поэтапно описан простой метод регистрации захвата ионов везикулами, который обычно используется для определения активности ацетилхолинового рецептора в реконструированных мембранах.

Первый метод, представленный на рис. 5.5, основан на стимулируемом агонистом захвате радиоактивно меченных ионов везикулами. Связывание агониста с рецептором открывает ионный канал, благодаря чему ионы проходят через мембрану до достижения равновесного распределения между везикулами и средой. Ионы, не вошедшие внутрь везикул, отделяют от захваченных ими ионов с помощью катионообменной колонки. Везикулы, содержащие захваченные ионы, можно также выделить из инкубационной смеси фильтрацией или центрифугированием, однако метод ионного обмена является более быстрым и, кроме того, позволяет избежать потери везикул малого размера, например за счет их прохождения через поры фильтра. В соответствии со схемой эксперимента (рис. 5.5) для остановки процесса захвата ионов везикулами к смеси через определенные промежутки времени добавляют ингибитор (кураре). Стадия ингибирования особенно важна при регистрации очень быстрых процессов с использованием системы быстрого смешивания [109], показанной на рис. 5.6. Добавлять ингибитор не требуется в тех случаях, когда реакцию проводят почти до состояния равновесия (10—30 с), как это описано в табл. 5.11. Обработав

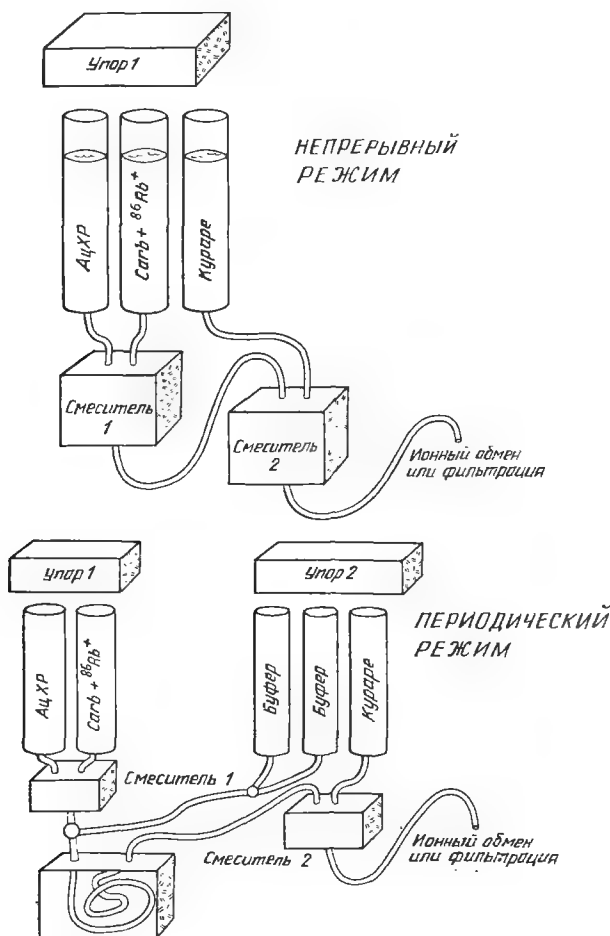


Рис. 5.6. Проточная система для регистрации активации ионного канала ацетилхолинового рецептора. Используются два основных режима. В непрерывном режиме мембраны, агонист и раствор ингибитора подаются из отдельных шприцев с помощью одного упора с пневматическим приводом. Чтобы уменьшить турбулентность потока, подачу осуществляют импульсами длительностью 100 мс. Время реакции между ацетилхолиновым рецептором и агонистом определяется длиной трубки между двумя смесителями. Ингибирование происходит во втором смесителе и затем производится отделение везикул от незахваченных ими ионов. Изменяя длину трубки, можно менять длительность реакции в интервале 10—100 мс. Для более длительных реакций используют периодический режим. Мембраны, меченые ионы и агонист смешивают и оставляют в трубке-накопителе. В определенный момент времени включают второй привод, буфером вытесняют реакционную смесь из трубки-накопителя и вводят ее в реакцию с ингибитором. Более подробное описание применяемой аппаратуры и анализа экспериментальных данных см. в работе [40]. (Из работы [40].)

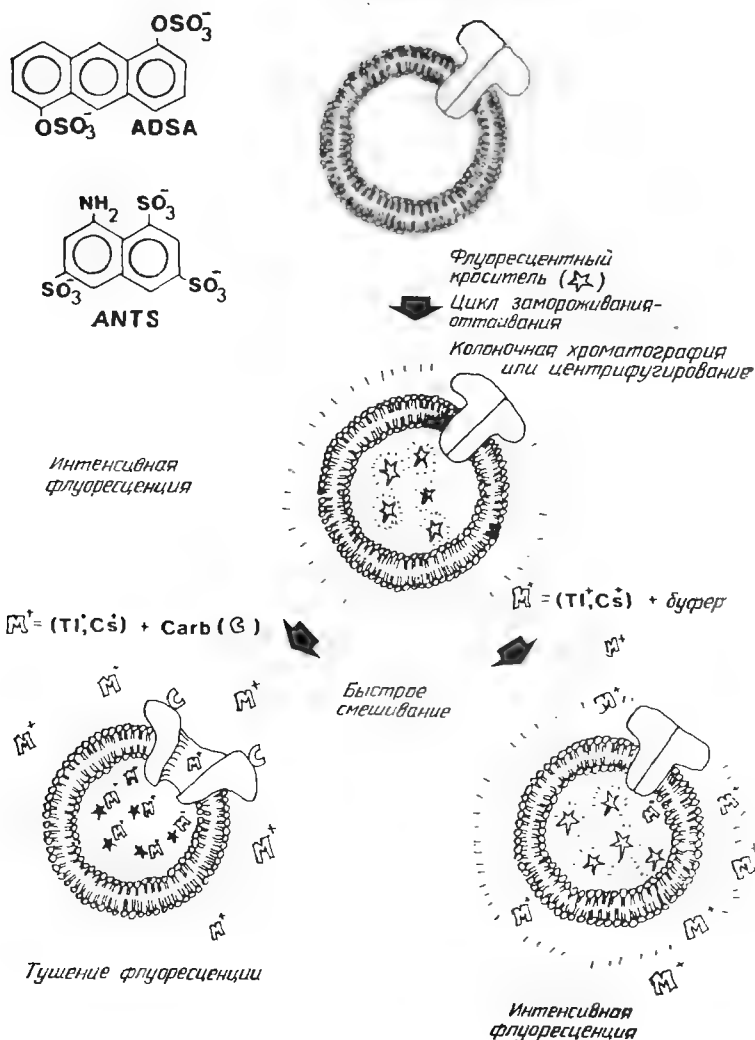


Рис. 5.7. Схема измерений методом тушения флуоресценции кинетики быстрого ионного транспорта в реконструированных везикулах, содержащих ацетилхолиновый рецептор, с помощью системы остановленной струи. Аппаратурная часть системы такая же, как и в методе проточного ингибирования. Основное отличие состоит в том, что флуоресценцию реакционной смеси измеряют непрерывно в кювете, расположенной после смесителя. Таким образом, на одном образце можно получить всю временную зависимость. (Из работы [40].)

Таблица 5.11. Методы определения транспортной активности ацетилхолинового рецептора с использованием ионообменных колонок (см. рис. 5.5)

1. Готовят колонку со смолой дауэкс.
 - а. Промывают 500 г катионообменной смолы дауэкс 50W-X8 (50—100 меш; Sigma Stock № 50X8-100) дистиллированной водой до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. К одному объему смолы в смеси с одним объемом воды добавляют 220 г трис-основания и инкубируют, осторожно перемешивая, в течение 1 ч при комнатной температуре. Проверяют pH (он должен быть равен 10,6). Тщательно промывают смолу дистиллированной водой до pH 7 (требуется по меньшей мере 25 промывок). Промывают несколько раз дважды дистиллированной водой и хранят при 4 °С.
 - б. Готовят колонку однократного использования объемом 2 мл (например, Isolab QS-Y), заполняя ее смолой почти доверху, и промывают 170 мМ раствором сахарозы, содержащим 3,3 мг/мл БСА (чтобы блокировать центры неспецифического связывания). Сливают буфер с колонки так, чтобы его уровень был чуть выше уровня смолы, и хранят ее до использования в закрытом состоянии при 4 °С.
2. Готовят растворы для регистрации захвата ионов. Их должно хватить на 50—60 анализов, что соответствует примерно 10 образцам. Объемы можно пропорционально увеличить или уменьшить.
 - а. IFA-1: смешивают 50 мкл исходного раствора Rb^+ и 250 мкл буфера БД-1 (табл. 5.5).
 - б. $Carb^{1)}$: растворяют 18,2 мг карбамилхолина в 1 мл воды (0,1 М Carb). Добавляют 100 мкл 0,1 М Carb к 700 мкл буфера БД-1 (12,5 мМ Carb).
 - в. IFA-1/Carb: смешивают 125 мкл IFA-1 и 125 мкл 12,5 мМ Carb.
 - г. IFA-1/Buf: смешивают 125 мкл IFA-1 с 125 мкл буфера БД-1.
3. Проводят анализ образцов.
 - а. К 50 мкл охлажденного во льду мембранного образца добавляют 10 мкл IFA-1/Carb или IFA-1/Buf.
 - б. Инкубируют в течение 30 с.
 - в. Отбирают 50 мкл и сразу же наносят на колонку со смолой дауэкс.
 - г. Сразу после того, как раствор впитается в смолу, добавляют 3 мл 175 мМ сахарозы. Собирают элюат непосредственно в сцинтилляционный флакон.
 - д. Просчитывают флаконы в сцинтилляционном счетчике.

Каждый образец необходимо анализировать по меньшей мере дважды — в присутствии и в отсутствие агониста. Колонки можно повторно использовать два или три раза без дополнительной обработки.

 - е. Стандарты: добавляют 10 мкл буфера IFA-1/Buf к 1 мл воды и просчитывают аликваты по 10 мкл.
 - ж. Фон: добавляют 50 мкл буфера БД-1 вместо мембранного препарата в одной серии определений.
 - з. Внутренний объем: инкубируют 200 мкл мембран с 40 мкл буфера IFA-1/Carb или IFA-1/Buf в течение 36—48 ч. Затем пропускают аликваты по 50 мкл через колонку с дауэксом, как описано выше.

¹⁾ Вместо карбамилхолина можно использовать другие агонисты.

рецептор агонистом еще до добавления меченых катионов, можно зарегистрировать кинетику инактивации канала.

Другой метод (рис. 5.7) основан на совершенно ином принципе. Если в замкнутые везикулы ввести флуоресцентный краситель, то при проникновении в них ионов тяжелых одновалент-

ных металлов будет происходить тушение флуоресценции. Рафтери и др. [110] методом остановленной струи регистрировали проникновение понов таллия в везикулы, в которые с помощью процедуры замораживания — оттаивания был включен флуоресцентный краситель. Кинетика тушения флуоресценции зависит от скорости проникновения одновалентных ионов внутрь везикул. Успешность применения данного подхода, как и методики, предложенной Хессом и др. [111], связана с тем обстоятельством, что ионный канал ацетилхолинового рецептора легко проникаем почти для всех одновалентных катионов.

4.2.2. Потенциалзависимые каналы

Более сложные проблемы возникают при регистрации ионных потоков через потенциалзависимые каналы, например через натриевые и кальциевые. В этом случае полностью реконструированной следует считать систему, в которой можно не только генерировать трансмембранный потенциал, но и менять его контролируемым образом. Пока никому не удалось провести реконструкцию так, чтобы полностью имитировать поведение нативного белка. Однако имеются токсины (например, вератридин), которые селективно связываются с натриевым каналом и фиксируют его в открытом состоянии. Ряд исследователей показали, что с помощью комбинации методов анализа связывания токсинов и регистрации ионных потоков можно осуществить функциональную реконструкцию очищенного натриевого канала в везикулах [112].

4.3. Общие замечания

Методы, описанные выше, можно применять практически ко всем мембранным системам, в которых осуществляется перенос веществ через мембрану. Основным лимитирующим фактором здесь, по-видимому, является целостность мембранных везикул. Даже если реконструкция приводит к образованию везикул с не векторной трансмембранной ориентацией белка, можно проводить регистрацию его активности в векторных условиях, вводя требуемый субстрат (или субстраты) только с одной стороны мембраны. Осложнения могут возникнуть в том случае, если транспортируемое вещество связывается с мембраной. Например, такие двухвалентные катионы, как кальций, связываются с довольно высоким сродством и с липидами, и с белками. Поэтому при измерении кальциевых потоков приходится проводить специальные эксперименты, чтобы ввести поправки на неспецифическое связывание.

С помощью комбинации методов анализа связывания лигандов, определения ферментативной активности и регистрации проницаемости/транспорта удается получать полезную количественную информацию о структуре и функциях многих мембранных белков как в солюбилизованном, так и в мембрано-связанном состоянии.

5. Новые возможности применения реконструированных мембран

Методы солюбилизации и реконструкции не только позволяют изучать функциональную активность белков; они могут оказаться очень полезными и при установлении структуры белковых молекул. Пожалуй, наиболее показательным примером в этом отношении является получение упорядоченных мембранных препаратов, пригодных для анализа третичной структуры белка.

5.1. Использование реконструированных мембран для изучения структуры белков

Структурные данные о мембранных белках с разрешением, необходимым для установления пространственного расположения полипептидной цепи, можно получить только с помощью дифракционных методов. Эти методы требуют наличия регулярно повторяющихся белковых структур. С помощью методов, основанных на дифракции света или электронов, можно изучать лишь двумерные мембранные кристаллические решетки, да и то при низком разрешении [113]. Для рентгеноструктурного же анализа высокого разрешения [2] необходимы трехмерные кристаллы. Метод структурного анализа белков с использованием реконструированных мембран находится пока еще в зачаточном состоянии. Двумерные кристаллы на основе реконструированных мембран удалось получить только для бактериородопсина (см. обзор [114]) и для светособирающих комплексов хлорофилл *a/b* [115]. Предварительные исследования, проведенные в лаборатории Страуда, показали, что можно вырастить трехмерные микрокристаллы реконструированного ацетилхолинового рецептора (S. Чое, личное сообщение). Ценность использования реконструированных мембран в исследованиях структуры белков очевидна, однако осуществить успешную кристаллизацию (двумерную либо трехмерную) нелегко, поскольку она зависит от многих факторов: типа и концентрации детергента, присутствия небольших амфифильных молекул (необходимых для заполнения пустот в кристаллической решетке) и фазового состояния мембранных липидов. Встраивание очищенного белка

в липид определенного типа не только упрощает исследуемую систему, но и позволяет изменять, вероятно, наиболее важные для мембранных белков условия, а именно — свойства границы раздела фаз. Другое преимущество использования реконструкции для кристаллизации мембранных белков состоит в том, что мембраны, которые в нативном состоянии образуют везикулы, при низком отношении липид/белок часто формируют незамкнутые пластинки [116]. Реконструкция изображения упрощается, когда имеется только один слой упорядоченного белка.

Ниже описан метод, который применил Ли [115], чтобы получить высокоупорядоченные решетки реконструированного мембранного белка. Светособирающие комплексы хлорофилла *a/b* выделяли из сеянцев гороха в 1,5%-ном (о/о) тритоне X-100 и включали их в азолектиновые везикулы методом замораживания — оттаивания [65]. Избыток тритона X-100 удаляли адсорбцией на смоле биобидс SM-2 и индуцировали образование решетки инкубацией мембран с 2 mM $MgCl_2$. Мембраны фракционировали в градиенте сахарозы (0—40%, в/о) в буфере, содержащем 0,03% тритона X-100. Наличие небольшого количества детергента облегчает удаление избытка липида и способствует включению контрастирующего реагента в липидную фазу. Реконструированные мембраны центрифугировали при 95000 *g* в течение 20 ч, сахарозу удаляли диализом или снижали ее концентрацию разбавлением и выделяли двумерные кристаллы или везикулы центрифугированием. Для электронно-микроскопического исследования препарат контрастировали 2%-ным (в/о) раствором уранилацетата. Реконструкция изображения по электронной микрофотографии дала трехмерную структуру белков с разрешением 30 Å.

6. Заключительные замечания

Несмотря на большие успехи, достигнутые мембранной биологией на всех направлениях, по-прежнему остается справедливым (если не полностью, то по крайней мере частично) замечание Рэкера [18], что «в области реконструкции мы не имеем никакой общей руководящей идеи, которая могла бы пригодиться при решении вновь возникающих задач. Мы не можем ни рекомендовать какой-либо универсальный детергент, подходящий для солюбилизации любых мембранных белков, ни предложить такую методику реконструкции, которая оказалась бы успешной для всех белков». Поэтому данная глава написана с целью высветить те основные принципы и практические подходы, которые можно было бы применить практически в любой схеме солюбилизации и реконструкции. Кроме того, в ней сде-

лана попытка привлечь внимание читателя к разнообразным возможностям применения реконструированных систем в мембранной биологии.

Литература

1. *Singer S. J., Nicolson G. L.* (1972). *Science*, **175**, 720.
2. *Michel H.* (1983). *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 56.
3. *Bennett A. B., O'Neill S. D., Spanswick R. M.* (1984). *Plant Physiol.*, **74**, 538.
4. *Hjelmeland L. M., Chrambach A.* (1984). In: *Methods in Enzymology*. Jakoby W. B. (ed.), Academic Press, New York and London, Vol. 104, p. 305.
5. *Klausner R. D., Van Renswoude J., Blumenthal R., Rivnay B.* (1984). In: *Receptor Biochemistry and Methodology*, Vol. 3. Venter J. C., Harrison L. C. (eds.), Alan R. Liss, New York, p. 209.
6. *Lichtenberg D., Robson R. J., Dennis E. A.* (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 285.
7. *Helenius A., Simons K.* (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 29.
8. *Reynolds J. A.* (1982). In: *Lipid — Protein Interactions*. Jost P. C., Griffith O. H. (eds.), Wiley, New York, Vol. 2, p. 193.
9. *Andersen J. P., LeMaire M., Kragh-Hansen U., Champeil P., Moller J. V.* (1983). *Eur. J. Biochem.*, **134**, 205.
10. *Earnest J. P., Stroud R. M., McNamee M. G.* (1986). *Biophys. J.*, **49**, 522a.
11. *Jackson M. L., Litman B. J.* (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 369.
12. *Roux M., Champeil P.* (1984). *FEBS Lett.*, **171**, 169.
13. *Tietz N. W. ed.* (1976). *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Saunders, Philadelphia.
14. *Akiyama T., Takagi S., Sankawa U., Inari S., Saito H.* (1980). *Biochemistry*, **19**, 1904.
15. *Siakatos A. N., Rouser G.* (1965). *J. Am. Oil Soc.*, **42**, 913.
16. *Morrison W. R., Smith L. M.* (1964). *J. Lipid Res.*, **5**, 600.
17. *Small D. M.* (1971). In: *The Bile Acids*. Nair P. P., Kritchevsky D. (eds.), Plenum Press, New York and London, p. 249.
18. *Giotta G. J.* (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 776.
19. *Garewal H. S.* (1973). *Anal. Biochem.*, **54**, 319.
20. *Griffith J. D.* (1957). *Chem. Ind.*, **30**, 1041.
21. *Terland O., Slinde E., Skotland T., Flatmark T.* (1977). *FEBS Lett.*, **76**, 86.
22. *Bar H. P., Kulshrestha S.* (1975). *Can. J. Biochem.*, **53**, 472.
23. *Tanford C.* (1980). *The Hydrophobic Effect*. 2nd Edition, Wiley, New York.
24. *Mittal K. L., Lindman B.* (1984). *Surfactants in Solution* Vol. 3. Plenum Press, New York.
25. *Rosen M. J.* (1984). *Structure — Performance Relationships in Surfactants*. ACS Symposium Series, Vol. 23, ACS, Washington.
26. *Rivnay B., Metzger H.* (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 12800.
27. *Mukerjee P., Mysels K. J.* (1971). *Critical Micelle Concentration in Aqueous Surfactant Systems*. National Bureau of Standards, NSRDS-NBS 36. Natl. Bur. Stds., Washington DC.
28. *Mukerjee P.* (1967). *Adv. Coll. Int. Sci.*, **1**, 241.
29. *Bordier C.* (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 1604.
30. *Huganir R. L., Racker E.* (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 9372.
31. *Noel H., Goswami T., Pande S. V.* (1985). *Biochemistry*, **24**, 4504.
32. *Devaux P. F., Seigneuret M.* (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 63.
33. *Warren G. B., Toon P. A., Birdsall N. J. M., Lee A. G., Metcalfe J. C.* (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 622.
34. *Robinson N. C., Strey F., Talbert L.* (1980). *Biochemistry*, **19**, 3656.

35. Jones O. T., Eubanks J. H., McNamee M. G. (1985). *Biophys. J.*, **47**, 493a.
36. Chang H. W., Bock E. (1977). *Biochemistry*, **16**, 4513.
37. Talvenheimo J. A., Tamkun M. M., Catterall W. A. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 11868.
38. Epstein N., Racker E. (1978). *J. Biol. Chem.*, **253**, 6660.
39. Anholt R., Fredkin D. R., Deerinck T., Ellisman M., Montal M., Lindstrom J. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 7122.
40. McNamee M. G., Jones O. T., Fong T.-M. (1986). In: *Ion Channel Reconstitution*. Miller C. (ed.), Plenum Press, New York, p. 231.
41. Rooney M. W., Lange Y., Kauffman J. W. (1985). *J. Biol. Chem.*, **259**, 8281.
42. Boyd N. D., Cohen J. B. (1980). *Biochemistry*, **19**, 5344.
43. Schreiber G., Henis Y. I., Sokolovsky M. (1985). *J. Biol. Chem.*, **260**, 8789.
44. Skou J., Esmann M. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **567**, 436.
45. De Meis L. (1981). *The Sarcoplasmic Reticulum*. Wiley, New York.
46. Aldrich R. W., Corey D. P., Stevens C. F. (1983). *Nature*, **306**, 436.
47. Criado M., Eibl H., Barrantes F. J. (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 9188.
48. Simmonds A. C., Rooney E. K., Lee A. G. (1984). *Biochemistry*, **23**, 1432.
49. Baldwin P. A., Hubbell W. L. (1985). *Biochemistry*, **24**, 2633.
50. Nedivi E., Schramm M. (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 5803.
51. Pick U., Bassilian S. (1983). *Eur. J. Biochem.*, **133**, 289.
52. Ackrell B. A. C., Kearney E. B., Coles C. J. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 6963.
53. Holloway P. W. (1973). *Anal. Biochem.*, **53**, 304.
54. Racker E. (1972). *J. Membr. Biol.*, **10**, 221.
55. Jackson M. L., Litman B. J. (1982). *Biochemistry*, **21**, 5601.
56. Kaback H. R. (1986). *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **15**, 279.
57. Popot J.-L., Changeux J.-P. (1984). *Physiol. Rev.*, **64**, 1162.
58. Furth A. (1980). *Anal. Biochem.*, **109**, 207.
59. Helentius A., Sarvas M., Simons K. (1981). *Eur. J. Biochem.*, **116**, 27.
60. Klausner R. D., Bridges K., Tsunoo H., Blumenthal R., Weinstein J. N., Ashwell G. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5087.
61. Radany E. W., Bellet R. A., Garbers D. L. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 695.
62. Deamer D. W., Uster P. S. (1983). In: *Liposomes*. Ostro M. J. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, p. 27.
63. Racker E., Violand B., O'Neal S., Alfonzo M., Telford J. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 470.
64. Kasahara M., Hinkle P. C. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 396.
65. McDonnell A., Staehelin L. A. (1980). *J. Cell Biol.*, **84**, 40.
66. Schullery S. E., Schmidt C. F., Felgner P., Tillack T. W., Thompson T. E. (1980). *Biochemistry*, **19**, 3919.
67. Muscatello U., Horne R. W. (1968). *J. Ultrastruct. Res.*, **25**, 73.
68. Henderson R., Unwin P. N. T. (1975). *Nature*, **257**, 28.
69. Dubochet J., Adrian M., Lepault J., McDowell A. W. (1985). *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 143.
70. Carlson S. S., Wagner J. A., Kelly R. B. (1978). *Biochemistry*, **17**, 1188.
71. Fong T.-M., McNamee M. G. (1986). *Biochemistry*, **25**, 830.
72. Mimms L. T., Zampighi G., Nozaki Y., Tanford C., Reynolds J. A. (1981). *Biochemistry*, **20**, 833.
73. Popot J.-L., Cartaud J., Changeux J.-P. (1981). *Eur. J. Biochem.*, **118**, 203.
74. Goldin S. M., Tong S. W. (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 5907.
75. Goldin S. M. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 5630.
76. Racker E., Chien T. F., Kandrach A. (1975). *FEBS Lett.*, **57**, 14.
77. Ochoa E. L. M., Dalziel A. W., McNamee M. G. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **727**, 151.

78. Strauss G., Hauser H. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2422.
79. Seto-Young B., Chen C.-C., Wilson T. H. (1985). *J. Membr. Biol.*, **84**, 259.
80. Van der Steen A. T. M., Taraschi T. F., Voorhout W. F., De Kruijff B. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **733**, 51.
81. Walker J. W., Lukas R. J., McNamee M. G. (1981). *Biochemistry*, **20**, 2191.
82. Tamkun M. M., Catterall W. A. (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 11457.
83. Carroll R. C., Racker E. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 6981.
84. Parise L. V., Phillips D. R. (1985). *J. Biol. Chem.*, **260**, 10698.
85. Anholt R., Lindstrom J., Montal M. (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 4377.
86. Criado M., Hochschwender S., Sarin V., Fox J. L., Lindstrom J. L. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2004.
87. Saito A., Wang C. T., Fleischer S. (1978). *J. Cell Biol.*, **79**, 601.
88. Herbet L., Scarpa A., Blasie J. K., Bauer D. R., Wang C. T., Fleischer S. (1981). *Biophys. J.*, **36**, 27.
89. Chen Y. S., Hubbell W. L. (1973). *Exp. Eye Res.*, **17**, 517.
90. Wickner W. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1159.
91. Agnew W. S. A. (1984). *Annu. Rev. Physiol.*, **46**, 517.
92. Klymkowsky M. W., Stroud R. M. (1979). *J. Mol. Biol.*, **128**, 319.
93. Levitzki A. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 127.
94. Schmidt J., Raftery M. A. (1973). *Anal. Biochem.*, **52**, 349.
95. Weber M., Changeux J.-P. (1974). *Mol. Pharmacol.*, **10**, 15.
96. Heidmann T., Changeux J.-P. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1897.
97. Dunn S. M. J., Raftery M. A. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6757.
98. Ross E. M., Gilman A. G. (1980). *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 533.
99. Smigel M., Katada T., Northup J. K., Bokoch G. M., Ui M., Gilman A. (1984). *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phos. Res.*, **17**, 1.
100. Brandt D. R., Ross E. M. (1985). *J. Biol. Chem.*, **260**, 266.
101. Brandt D. R., Asano T., Pedersen S. E., Ross E. M. (1983). *Biochemistry*, **22**, 4357.
102. Citri Y., Schramm M. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 13257.
103. Keenan A. K., Gal A., Levitzki A. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 615.
104. Shorr R. G. L., Strohsacker M. W., Lavin T. N., Lefkowitz R. J., Caron M. G. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 12341.
105. Pedersen S. E., Ross E. M. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7228.
106. Fleming J. W., Ross E. M. (1980). *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **6**, 407.
107. Curtis B. M., Catterall W. A. (1984). *Biochemistry*, **23**, 2113.
108. Racker E., Stoeckenius W. (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 662.
109. Cash D. J., Hess G. P. (1981). *Anal. Biochem.*, **112**, 39.
110. Moore H.-P. H., Raftery M. A. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4509.
111. Karpen J. W., Sachs A. B., Cash D. J., Pasquale E. B., Hess G. P. (1983). *Anal. Biochem.*, **135**, 83.
112. Tanaka J. C., Furman R. E., Barchi R. L. (1986). In: *Ion Channel Reconstitution*, Miller C. (ed.), Plenum Press, New York, p. 277.
113. Amos L. A., Henderson R., Unwin P. N. T. (1982). *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **39**, 183.
114. Stoeckenius W., Bogomolni R. A. (1982). *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 587.
115. Li J. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 386.
116. De Grip W. J., Olive J., Bovee-Geurts P. H. M. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **734**, 168.
117. Tanford C., Nozaki Y., Rhode M. F. (1977). *J. Chem. Phys.*, **81**, 1555.
118. Racker E. (1983). In: *Liposome Letters*, Bangham A. D. (ed.), Academic Press, London, p. 179.
119. Levitzki A. (1984). *Receptors — A Quantitative Approach*. Benjamin/Cummings Co., Menlo Park, CA.

ВЫДЕЛЕНИЕ И МОДИФИКАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Джон Б. Финдлей

1. Введение

В зависимости от характера связи с бислоем мембранные белки подразделяют на интегральные (внутримембранные) и периферические (поверхностные). Предполагается, что белки первой группы глубоко погружены в липидный бислой и своей гидрофобной поверхностью контактируют преимущественно с окружающими жирнокислотными цепями и молекулами холестерина. Участки полипептидной цепи, обращенные в водную среду, аналогичны так называемым «водорастворимым» белкам. Поэтому интегральные белки обычно называют амфифильными. Периферические белки связываются с поверхностью мембраны благодаря полярным взаимодействиям либо с фосфолипидами, либо с другими мембранными белками. Хотя отдельные участки на поверхности периферических белков могут быть гидрофобными, в целом поверхность белковых молекул этого типа является гидрофильной.

В этой главе описаны общие методы солюбилизации и очистки мембранных белков и пептидов, а также способы введения в них разнообразных мембранных меток. Поскольку набор используемых растворителей, детергентов, хроматографических носителей и методик выделения почти так же велик, как и число подлежащих выделению белков, здесь можно дать только общие указания по разработке схемы очистки, уделив при этом особое внимание некоторым важным принципам и практическим рекомендациям. Можно надеяться, что на основе полученной информации читателю удастся легко разработать свои подходы к решению стоящих перед ним проблем. Методы модификации белков являются более рутинными, и здесь мы детально опишем те из них, применение которых для изучения мембран оказалось наиболее успешным.

2. Солюбилизация мембранных белков

Структурная классификация белков, о которой мы только что говорили, легко объясняет особенности их поведения при выделении. Периферические белки удастся солюбилизировать, почти не нарушая целостности мембраны, тогда как выделение

интегральных белков обычно требует ее разрушения. Общие принципы и методы солиubilизации интегральных мембранных белков с помощью детергентов или хаотропных агентов уже рассматривались в предыдущей главе, и поэтому мы обсудим их здесь лишь вкратце. Следует, однако, отметить, что перед солиubilизацией интегральных белков часто бывает полезно удалить периферические белки, особенно если предусматривается последующее фракционирование выделенных белков.

2.1. Периферические белки

В зависимости от задачи, которая стоит перед исследователем, мембрана может быть подвергнута мягкой или жесткой обработке.

При мягких условиях обработки используют как растворы с низкой ионной силой (например, 0,1—1 мМ ЭДТА, который удаляет двухвалентные катионы [1, 2]), так и буферы с высокой ионной силой, содержащие NaCl и KCl в концентрации более 1 М [2, 3], с добавлением ЭДТА или без нее. Не следует вводить в эти растворы такие анионы, как подид или динодсалицилат, поскольку они обладают хаотропными свойствами и могут действовать подобно детергентам. pH среды может меняться в пределах от 6,0 до 8,0. В этих условиях необратимая денатурация интегральных или периферических белков маловероятна.

При более жесткой обработке из мембран можно удалить значительные количества белка (>50% от его общего содержания в мембранах), но, с другой стороны, такая обработка обычно приводит к денатурации, во многих случаях необратимой. В качестве примера можно привести обработку мембран 6 М гуанидинийхлоридом [4], 8 М мочевиной, 1 мМ *n*-хлормеркурибензоатом [5], разбавленными кислотами (pH 2,0—3,0) [6] или щелочами (pH 9,5—11,0) [7]. В кислых условиях иногда наблюдается осаждение солиubilизированных белков, и поэтому чаще прибегают к щелочной обработке.

Необходимо иметь в виду, что в результате удаления значительных количеств белка мембрана может морфологически измениться, в частности может произойти ее выворачивание или замыкание в везикулы. Поэтому следует так подобрать условия последующего центрифугирования, чтобы гарантировать полное осаждение мембран (гл. 1). Если используется кислотнo-щелочная обработка, следует как можно быстрее вернуть pH к исходным нейтральным значениям.

2.2. Интегральные белки

Принципы и методы солиubilизации мембран с помощью детергентов и хаотропных агентов изложены в гл. 5. Важно отметить, что при такой обработке могут высвобождаться или акти-

вироваться протеазы. Поэтому нередко на этой стадии приходится добавлять ингибиторы протеаз, даже если они уже были введены на предыдущих этапах выделения мембран. Существуют разные и довольно сложные смеси ингибиторов, которые можно использовать в зависимости от чувствительности системы к действию протеолитических ферментов. Весьма полезным, но не универсальным агентом является ингибитор сериновых протеаз, фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ). Этот реагент хранят в концентрации 100 мМ в изопропанолe или этаноле и добавляют в инкубационную среду до концентрации 100 мкМ. Следует помнить, что он имеет довольно короткое время жизни в водных средах (110 и 35 мин соответственно при pH 7,0 и 8,0 и 25°C [8]). Для ингибирования SH-протеаз может оказаться полезным 10 мМ тетратионат натрия. Сведения о других ингибиторах (специфичности и области применения) можно найти в гл. 1 (табл. 1.3).

2.2.1. Распределение в двухфазной системе

Своеобразный, иногда очень полезный подход к разделению интегральных и периферических белков основан на их распределении в двухфазной системе. Этот метод оказался особенно успешным, когда применяли тритон X-114 [9]. Чтобы получить как можно более гомогенный препарат тритона X-114, проводят следующие операции.

1. Добавляют 10 г тритона X-114 и 8 мг бутилзамещенного гидрокситолуола к 20 мМ раствору фосфата калия (pH 7,5), содержащему 0,15 М KCl, так чтобы конечный объем смеси составил 200 мл.

2. Охлаждают смесь до 0°C, чтобы удостовериться в полном растворении компонентов, и затем инкубируют ее в течение ночи при 35°C.

Очищенный детергент при температурах выше 20—25°C дает отдельную фазу меньшего объема, которую можно выделить мягким центрифугированием и подвергнуть, если необходимо, повторной обработке. Солюбилизацию мембран проводят следующим образом.

1. При 0—4°C добавляют тритон X-114 до концентрации 2% к мембранному препарату (1—3 мг/мл по белку) в 10 мМ трис-HCl или в фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 150 мМ NaCl или KCl.

2. Инкубируют смесь при 0—4°C в течение 1 ч и затем центрифугируют (100 000 г, 1 ч) для удаления нерастворившегося материала.

3. Раствор наносят на слой забуференной 6%-ной сахарозы в центрифужной пробирке подходящего размера.

4. Нагревают до 25—30 °С за 5 мин и затем центрифугируют в течение примерно 5 мин при 100 g и температуре выше 20 °С.

5. Фаза детергента образует маслянистый слой на дне пробирки. Водную фракцию можно снова смешать с 0,5%-ным (в/о) тритоном X-144, а детергентную фазу — с водным буфером и повторить процесс.

Эта методика основана на необычных свойствах детергента, который при 0 °С растворим в водном буфере, а выше 20 °С выделяется в виде отдельной фазы. При этом гидрофильные (т. е. периферические) белки попадают в водную фазу, а гидрофобные оказываются в детергентной фазе. Как нередко бывает при использовании детергентов, изучаемый белок может оказаться нерастворимым, ненативным или неактивным в тритоне X-114, и это надо выяснить с самого начала. Если белок нерастворим, его можно выделить, проведя центрифугирование солюбилизата при 0 °С. Интегральные белки с повышенной гидрофильностью (например, белки, имеющие один трансмембранный полипептидный сегмент и/или содержащие значительное количество ковалентно связанных углеводов) могут оказаться в водной фазе вследствие самоассоциации или связывания детергента, часть которого всегда присутствует в водной фазе. Отмечено также, что каналобразующие белки (например, ацетилхолиновый рецептор, АТРазы) также могут аномально распределяться в двухфазной системе [10, 11]. Применение этого метода описано в работе [12].

2.2.2. Удаление липидов

Солюбилизация мембраны детергентом обычно приводит к образованию смешанных мицелл, содержащих как фосфолипиды, так и детергент. Большинство интегральных белков (вместе с другими белками или без них) находятся в солюбилизате в виде комплексов, имеющих мономолекулярную оболочку из детергента (см. рис. 5.1). Эти комплексы могут удерживать небольшое остаточное количество фосфолипидов. Часто эти липиды удаляются при последующей очистке, но в некоторых случаях при особо прочном связывании липидов для их удаления может потребоваться экстракция органическими растворителями или денатурация белка с помощью ДСН или органических растворителей.

1. *Органические растворители.* Для солюбилизации белков использовали такие органические растворители, как хлороформ, смесь хлороформа с метанолом (а также с этанолом или бутанолом), 1-бутанол, смесь диэтиловый эфир/этанол (3:1, о/о) [13—16]. Белки, солюбилизирующиеся в этих условиях, часто относят к классу протеолипидов. Они очень гидрофобны и обла-

дают слабо выраженной амфифильностью; в большинстве мембран такие белки содержатся лишь в малых количествах. Для примера здесь можно привести ДЦК-связывающий белок из АТР-синтазного комплекса [17] и протеолипидные белки миелина. Все они растворимы в смеси хлороформ/метанол (2:1, о/о) [13]. При использовании смеси хлороформ/метанол/водный буфер (8:4:3, о/о) большинство мембранных белков образуют осадок на границе раздела водной и органической фаз, а все протеолипиды переходят в слой органического растворителя. В водной фазе обнаруживаются сильно гликолизированные компоненты мембран, например гликофорин и гликолипиды. Меняя соотношение хлороформ/метанол, можно до некоторой степени варьировать состав экстрагируемых белков [18]. Определенные преимущества дает также экстракция мембран подкисленной смесью хлороформ/метанол (2:1, о/о), содержащей до 50 мМ HCl [19] или 5 мМ *n*-толуолсульфокислоты [20]. При этом удастся несколько увеличить количество белков, попадающих в органическую фазу, и изменить их состав.

Экстрагированные белки легко выделить, удалив органический растворитель на ротормном испарителе, а в некоторых случаях их удастся осадить, добавив 10—20 объемов холодного ацетона, 5—10 объемов холодного диэтилового эфира или смесь диэтилового эфира и этанола различного состава (от 1:1 до 3:1, о/о). Таким же образом выделяют белки из детергентных растворов. Если при выделении используются неподкисленные смеси органических растворителей, то биологическая активность экстрагированного белка может сохраниться; иное дело — если используются подкисленные растворители или белок выделяется осаждением.

Сравнительно недавно предложены две системы растворителей, позволяющие получать хотя и в денатурированном состоянии, но в растворимой форме почти все интегральные мембранные белки (а фактически также почти все водорастворимые белки). Первая из этих систем — смесь муравьиная кислота/этанол (3:7 или 1:2, о/о) — использовалась для исследования бактериородопсина [21] и родопсина [22]. Она наиболее пригодна для белков, не содержащих связанных липидов или детергентов. Вторая система — муравьиная кислота/уксусная кислота/хлороформ/этанол (1:1:2:1, о/о) [23, 24] — растворяет большинство мембранных белков; еще одно ее преимущество состоит в том, что при этом удаляются все фосфолипиды и предотвращаются агрегация белка и самоассоциация липида. Это значительно облегчает последующее фракционирование. Последняя система растворителей (обозначаемая английской аббревиатурой FACE) особенно полезна при солиubilизации интактных мембран. Ее лучше всего добавлять к плотному осадку

мембран, содержащему лишь небольшое количество влаги, которая легко переходит в растворитель. В обеих системах этанол можно заменить метанолом, однако следует учитывать, что сефадекс LH, который можно использовать с этими смесями растворителей, лучше упаковывается в присутствии этанола. Уксусная кислота необходима для того, чтобы предотвратить разделение фаз при стоянии. Имейте в виду, что многие интегральные мембранные белки после солюбилизации и фракционирования в этих системах плохо переходят в водные растворы, содержащие все детергенты, кроме ДСН; используя же этот детергент, можно достичь довольно хорошей солюбилизации. Рассмотрим теперь способы очистки экстрактов.

3. Хроматографическое разделение белков

Периферические белки, извлекаемые из мембран в условиях, описанных выше, ведут себя как обычные водорастворимые белки и их можно фракционировать с помощью стандартных приемов, которые основаны на различиях белков по размеру, заряду и специфичности взаимодействия с лигандами. Эти методы детально описаны в других книгах данной серии, посвященных ВЭЖХ и аффинной хроматографии. Здесь мы рассмотрим главным образом специальные методы, применимые в первую очередь для разделения мембранных белков и пептидов. Тем не менее многие описанные здесь методики и системы растворителей с некоторыми изменениями или даже без таковых легко можно использовать и для фракционирования периферических белков.

3.1. Разделение по размеру

Если изучаемый белок стабилен, то фракционирование имеет смысл начать с гель-фильтрации в водном буфере, содержащем детергент в концентрации, равной или превышающей критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ). Интегральные белки, окруженные мономолекулярной «шубой» детергента, могут иметь кажущуюся молекулярную массу, вдвое превышающую ту, что отвечает их аминокислотной последовательности. Кроме того, многие белковые комплексы не подвергаются диссоциации в неденатурирующих детергентах. Поэтому для колоночной хроматографии принято использовать крупнопористую сефарозу, агарозу и полиакриламид (см. также гл. 5). В некоторых случаях могут возникнуть затруднения в связи с агрегацией белков или их необратимой адсорбцией на хроматографических носителях, но, вообще говоря, эффективность начальных этапов фракционирования зависит прежде всего от правильного

выбора детергента. Если есть опасения, что может произойти необратимая адсорбция белка, можно попытаться заменить носитель. Например, носители, приготовленные на основе полиакриламида, как правило, более инертны. Их можно использовать как с мягкими, так и с жесткими (т. е. денатурирующими) детергентами, но следует проявлять осторожность при работе с органическими растворителями. Для последних требуются специальные модифицированные носители (см. ниже).

Весьма полезным для фракционирования интегральных мембранных белков может оказаться и применение хроматографических систем, основанных на принципах ВЭЖХ и скоростной жидкостной хроматографии белков (СЖХБ), особенно в тех случаях, когда процесс очистки лимитируется количеством белка и временем его фракционирования. В настоящее время имеется богатый выбор носителей для ВЭЖХ и СЖХБ, главным образом на основе силикагеля и синтетических полимерных материалов (например, гидроксированных полиэфиров), и их ассортимент постоянно расширяется. Размер пор выбираемого носителя определяется диапазоном молекулярных масс разделяемых белков. Фирмы-поставщики предлагают носители, позволяющие разделять белки с мол. массой от 500 до $2 \cdot 10^7$. В присутствии неденатурирующих детергентов эффективность разделения, как правило, снижается. Большинство имеющихся в продаже носителей можно использовать в нейтральных органических растворителях, детергентах и в присутствии денатурирующих агентов, таких, как гуанидингидрохлорид и ДСН. По нашим данным, сорбенты типа TSK (например, Ultracac SW фирмы LKB) вполне годятся для белков, солюбилизованных в ДСН.

Особенно осторожным следует быть, когда разделение проводится при экстремальных значениях pH. Этому есть две причины. Во-первых, в очень кислых условиях, часто применяемых при разделении в сочетании с органическими растворителями, ускоряется разрушение носителей, приготовленных на основе силикагеля. (Еще более разрушительными являются щелочные условия при $\text{pH} > 8$.) В результате удаления с носителя защитных групп усиливается необратимая адсорбция на нем полипептидов. Во-вторых, существует опасность повреждения тех элементов аппаратуры для ВЭЖХ, которые сделаны из нержавеющей стали, поскольку в используемых смесях растворителей содержится агрессивная муравьиная кислота. Некоторые изготовители этой аппаратуры утверждают, что они используют высококачественную нержавеющую сталь, которая устойчива к этим воздействиям; другие предпочитают изготавливать смешительные камеры с керамическим или титановым покрытием.

К счастью, здесь есть возможность альтернативных подхо-

дов. Если белок имеется в достаточном количестве, то его очистку можно проводить на гидроксипропилированных декстранах (сефадексы LH-60 и LH-20), используя почти все мыслимые смеси органических растворителей и кислот. В этом отношении полезны система растворителей FACE и смесь муравьиной кислоты с этанолом, особенно первая, поскольку она обычно позволяет хроматографически удалять все детергенты и липиды, переводя их в низкомолекулярную мономерную форму. *Помните, что все детали хроматографической аппаратуры, контактирующие с этими системами органических растворителей, должны быть изготовлены из стекла и тефлона.* Отдельные белки и многие пептиды растворяются (некоторые в виде агрегатов) в муравьиной кислоте, концентрация которой может достигать 90% (о/о). В таких экстремальных условиях можно использовать носители типа сефадекса и полиакриламида для фракционирования компонентов смеси по размеру. Однако подобные условия разрушительно действуют как на носитель, так и на пептид, поэтому хроматографию следует проводить при низких температурах и высоких скоростях элюирования. Само собой разумеется, что носители нельзя хранить в этих растворителях.

При использовании агрессивных органических растворителей полезной может оказаться также система СЖХБ фирмы Phastasia. Основные детали этой аппаратуры изготовлены главным образом из тефлона и стекла и поэтому менее подвержены разрушению под действием кислот. Носители на основе силикагеля, пока используемые в лабораторной практике чаще всего, по-видимому, более устойчивы к этим растворителям. Недостатком носителей на основе агарозы (суперозы) является их склонность к необратимой адсорбции мембранных белков. Эти носители более пригодны для гель-фильтрации, хотя при этом приходится прибегать к использованию детергентов. Носители на основе силикагеля лучше всего подходят для хроматографии с обращенной фазой (см. ниже). ВЭЖХ- и СЖХБ-анализ осуществляется намного быстрее (за 30—60 мин), чем анализ с использованием обычных стеклянных колонок, и часто дает лучшее разделение компонентов в соответствии с поставленной задачей. Однако емкость колонок ограничена, и может потребоваться повторить много раз хроматографию идентичных проб исходного образца. Важно при этом не перегружать колонку и не задавать слишком высокую скорость элюирования. Для грубой ориентировки можно рекомендовать следующее правило: нужно наносить не более 1 мг общего белка на 1 мл упакованного носителя и проводить элюирование не быстрее, чем за 30 мин, но не дольше 90 мин.

3.2. Разделение по заряду

3.2.1. Ионообменная хроматография

Для выделения мембранных белков можно использовать все классические ионообменные системы, которые применяются для очистки белков, при условии, что исходный заряд полипептида не нейтрализуется при добавлении заряженных детергентов или при его растворении в сильных кислотах или щелочах. Наиболее популярными пока остаются слабозаряженные ДЭАЭ- и КМ-иониты (на основе, например, целлюлозы и декстрана), но, если их используют в присутствии детергента, следует удостовериться, что последний сам по себе не препятствует взаимодействию белка с адсорбентом. Эффективность очистки на этих носителях в значительной мере зависит от природы выделяемого белка. Если белок преимущественно гидрофилен, можно подобрать условия, при которых он будет прочно связываться с ионитом. Напротив, белки, которые в значительной степени погружены в бислой и потому после солиubilизации плотно окутаны детергентной оболочкой, имеют намного меньшие возможности для взаимодействия с заряженным адсорбентом.

С учетом этого ДЭАЭ-колонки обычно уравнивают буфером довольно низкой ионной силы (например, $<0,1$ М трис-НСI или фосфатным буфером), содержащим детергент (порядка 0,1%) и, возможно, фосфолипид (0,1%), при pH 6,5—8,0. Элюирование проводят солевыми растворами возрастающей концентрации (например, 0—1 М NaCl или KCl), которые также содержат детергент и/или фосфолипид [25]. КМ-сорбенты обычно уравнивают при слабо кислых pH (5,5—7,0), а для элюирования чаще всего используют растворы с градиентом pH, а не соли. Описано разделение на ДЭАЭ- [26] и КМ-целлюлозе [27] с помощью смесей органических растворителей (например, хлороформ/метанол) с различным содержанием воды, но в большинстве случаев это скорее вынужденная мера, а не способ, который можно было бы рекомендовать в качестве универсального.

Наконец, для ВЭЖХ и СЖХБ получены ионообменные силикагели и синтетические смолы с различными размерами пор [28—30]. По своей емкости в расчете на общий белок они по крайней мере в 20—30 раз эффективнее, чем обычные носители для гель-фильтрации. Во многих отношениях их можно использовать так же, как и обычные носители, и им присущи те же достоинства и недостатки, которые обычно проявляются в стандартных системах ВЭЖХ и СЖХБ. Еще одним носителем, применение которого оказалось успешным для исследования мембранных систем [31], является гидроксипатит. В больших колонках его использование затруднено: возникают проблемы,

связанные со скоростью элюирования и выходом белка; этот носитель более приемлем в случае ВЭЖХ. Имеется также целый ряд слабых и сильных ионообменных сорбентов, которые могут оказаться полезными для фракционирования мембранных белков, но пока еще не нашли достаточно широкого применения (см. каталоги фирм-поставщиков, например BioRad).

3.2.2. Изоэлектрическое фокусирование

Для мембранных белков в нативном состоянии характерно такое же различие по изоэлектрическим точкам, как и для водорастворимых белков. Эти различия можно использовать для эффективной очистки белков методом изоэлектрического фокусирования. Белки мигрируют под действием электрического поля в градиенте pH, и, когда данный белок достигает области, соответствующей его изоэлектрической точке, дальнейшая миграция прекращается — он как бы «фокусируется». Этим методом можно достичь очень тонкого разделения компонентов, вплоть до отделения фосфорилированного белка от его нефосфорилированной формы [32]. Некоторые примеры применения изоэлектрического фокусирования для разделения мембранных белков можно найти в недавно опубликованных статьях [33—36].

В работах [37, 38] и в методических руководствах, публикуемых фирмами — изготовителями соответствующего оборудования (например, Pharmacia или LKB), можно найти описание различных способов формирования градиента pH с помощью амфолитов при использовании ряда стабилизаторов — полиакриламидных и агарозных гелей или градиента плотности глицерола, сахарозы и сорбитола. Там же описаны способы нанесения белка и проведения электрофореза. Для растворения мембранных белков необходимы детергенты, и их следует подобрать таким образом, чтобы они не изменяли заряда белка, не искажали градиента pH и сами не подвергались фокусированию. Обычно это неионные детергенты, хотя в принципе можно использовать и цвиттер-ионные соединения. Как правило, полезно начинать фракционирование с довольно широкого диапазона pH (3—10), постепенно сужая его до 2 единиц, так чтобы примерно в середине этого интервала фокусировался изучаемый белок. При исследовании основных мембранных белков ($pI \sim 7$) часто бывает полезно дополнительно проводить электрофорез в формирующемся градиенте pH (метод NEPHGE), когда образец наносят в кислой зоне геля [39]. В этой системе градиент pH не достигает полностью равновесного состояния, и потому положение белка не соответствует точному значению его pI . Разделение обычно проводят при 0—4 °C и продолжают его

еще по меньшей мере в течение 25% времени (обычно 1—2 ч), требуемого для достижения постоянного напряжения. Этот метод можно использовать как для аналитического, так и для препаративного разделения. В последнем случае после завершения фокусирования носитель с помощью насоса осторожно, чтобы избежать перемешивания, перекачивают в коллектор фракций. Эффективность разделения в значительной мере зависит от наличия чувствительного метода количественного определения изучаемого белка, от солибилизирующей способности детергента по отношению к этому белку и — что особенно важно — от возможности предотвратить его агрегацию и/или осаждение.

Одна из возможных проблем — особенно серьезная, если предполагается проводить анализ белка с целью установления его первичной структуры, — связана с трудностями полного удаления амфолитов. Обычно рекомендуют осаждать белок добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до концентрации, составляющей 80—100% от насыщающей. Если таким образом не удастся осадить белок, его можно адсорбировать на гидрофобной колонке, например на фенил- или октилсефарозе; ее берут из расчета 1 мл на 1 мг белка и уравнивают $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, взятым в концентрации 80—100% от насыщающей. Сорбент затем промывают 3—5 объемами буфера, эквивалентными объему колонки, для удаления амфолита и элюируют белок растворами низкой ионной силы, например 0,1 М бикарбонатом аммония. К сожалению, в случае интегральных мембранных белков, находящихся в детергентных растворах, ни эти способы, ни непосредственная гель-фильтрация, ни длительный диализ не дают достаточно хороших результатов. Если можно не беспокоиться о сохранении биологической активности белка, полезной может оказаться гель-фильтрация на сефадексе LH-60, который уравнивают и затем элюируют смесью муравьиной кислоты с этанолом или системой FACE (см. выше). Эффективное удаление амфолитов достигается на колонке объемом 100 мл, при этом белок (с мол. массой $>15\,000$) выходит в свободном объеме колонки, а амфолиты — в ее внутреннем объеме.

3.2.3. Хроматофокусирование

Пожалуй, наиболее перспективным методом очистки интегральных мембранных белков является хроматофокусирование [40, 41], которое больше подходит для препаративных, чем для аналитических целей. Этот метод сходен с изоэлектрическим фокусированием, отличаясь от последнего тем, что градиент pH формируется не в буфере, а на неподвижном наполнителе колонки. Эти наполнители устойчивы в диапазоне pH от 3 до 12,

но обычно лучше всего работают в интервале рН 5—9. Их можно использовать в сочетании с нейтральными органическими растворителями, с денатурирующими агентами (такими, как 8 М мочеви́на и 6 М гуанидингидрохлорид), а также с детергентами — как незаряженными (например, дигитонин, гри́тон X-100), так и цвиттерионными (CHAPS). Метод является быстрым, эффективным и сравнительно недорогим. Полибуферный носитель можно удалять так же, как описано выше для амфолитов. По запросам фирма Pharmacia может выслать информационную брошюру с описанием теоретических и практических аспектов этого многообещающего метода.

3.3. Гидрофобная хроматография

В настоящее время все более широкое применение находит также гидрофобная хроматография, при которой белки и пептиды связываются с гидрофобными группами, ковалентно пришитыми к носителю. Адсорбция белков на носителе, например на октил- или фенилсефарозе или на суперозе, происходит за счет гидрофобных взаимодействий и усиливается при высоких концентрациях солей (например, в 50—80%-ном сульфате аммония), при низких рН и при высоких температурах. Белок затем элюируют солевыми растворами с уменьшающейся концентрацией. Чтобы улучшить разделение и повысить выход белка с колонки, в элюирующий буфер можно включить этиленгликоль, метанол или этанол. Такой же результат дает повышение рН и понижение температуры. Следует, однако, указать на ограниченную применимость этого подхода для большей части интегральных мембранных белков. Во-первых, эффективность модифицированного носителя резко снижается в присутствии детергента (и еще сильнее в присутствии органических растворителей). Во-вторых, разделение интегральных мембранных белков скорее всего будет неудовлетворительным. В некоторых случаях этот метод может оказаться полезным для отделения интегральных белков от периферических.

3.3.1. Хроматография с обращенной фазой

Это особый вид гидрофобной хроматографии, наиболее близкой к ВЭЖХ и СЖХБ. К макропористому носителю (с диаметром пор 250 Å и выше) химически пришивают цианпропильные или (ди)фенильные остатки либо чаще всего *n*-алкильные цепи, содержащие от 2 до 18 CH_2 -групп. Как правило, чем крупнее и гидрофобнее белок или пептид, тем короче должна быть углеводородная цепь на носителе (цепь C4 особенно эффективна для крупных пептидов, а цепь C18 — для малых).

Чтобы продлить срок использования носителя и уменьшить вероятность возникновения артефактов, следует выбирать такие носители, которые были подвергнуты защитной модификации, т. е. блокированию силанольных остатков, не содержащих цепей C4-C18, с помощью низкомолекулярных разветвленных силанов.

Большое значение имеет выбор *растворителя* (подвижной фазы), хотя следует отметить, что до сих пор предложено лишь ограниченное число систем. Вследствие нестабильности силикагелевых носителей растворители с щелочными рН использовать не следует, в то же время при нейтральных рН часто происходит уширение пиков и ухудшается разделение. Это объясняется взаимодействием аминокрупп пептида с силанольными остатками носителя. В кислых условиях силанольные группы протонированы и поэтому преобладают гидрофобные взаимодействия. При разделении обычной смеси пептидов элюирование, как правило, начинают с 0,01—0,1%-ной трифторуксусной (ТФУ) или пентафтормасляной кислоты. Вместо них можно использовать фосфорную или хлорную кислоту в концентрации до 0,1%, чтобы повысить гидрофильность пептидов, но при разделении гидрофобных пептидов эти добавки применяют редко. Может оказаться полезным включение в водные системы органических аминов, например фосфата триэтиламина (0,1%), благодаря чему ослабляются ионные взаимодействия между носителем и пептидом. Добавление в небольшом количестве органических растворителей может повысить растворимость пептидов.

Образцы следует наносить на колонку в небольшом объеме (около 100 мкл) водного растворителя. Для растворения сильно гидрофобных белков и пептидов может понадобиться использовать 90%-ную муравьиную кислоту. Хотя эти условия неблагоприятны для носителя, их все же можно применять для нанесения образца на колонку. По мере разбавления муравьиной кислоты пептиды адсорбируются (или осаждаются?) на носителе. Затем их элюируют системами с возрастающим градиентом органического растворителя, т. е. системами с уменьшающейся полярностью. Полезно помнить следующий ряд полярности: вода > метанол > этанол > ацетонитрил > 1-пропанол > 2-пропанол > бутанол. Особенно широко используется ацетонитрил — он обладает низкой вязкостью и хорошей растворяющей способностью; кроме того, его можно приобрести за умеренную цену в очищенном виде (без примесей, поглощающих в УФ-области). Как пример типичного градиента можно указать переход от 0,1%-ной ТФУ, содержащей 10% ацетонитрила, до 0,1%-ной ТФУ, содержащей 70% ацетонитрила. Для улучшения растворимости пептидов предложено вводить в небольших количествах такие добавки, как монометоксиэтиленгликоль. Если

использовать подобные подвижные фазы, то пептиды, нанесенные в растворах сильных кислот и в начале хроматографии практически нерастворимые, при нарастании градиента органического растворителя могут перейти в раствор и элюироваться при его достаточно высоких концентрациях.

К сожалению, многие из крупных и гидрофобных пептидов, образующихся при расщеплении интегральных мембранных белков, не элюируются вообще или вымываются с очень низким выходом с помощью C18-носителей и растворителей, указанных выше. В этих случаях нередко приходится прибегать к жестким условиям. Так, Корана и др. [42] использовали на C18-сорбенте градиентный переход от 5%-ного водного раствора муравьиной кислоты до 5%-ного раствора этой же кислоты в этаноле. Нам удалось достичь определенных успехов при переходе от 50%-ной муравьиной кислоты в воде до 50%-ной муравьиной кислоты в изопропанолe или этаноле (Medina, Findlay, неопубликованные данные). В обоих случаях целесообразно использовать аппаратуру и колонки для проведения СЖХБ (фирма Pharmacia), поскольку они более устойчивы в таких жестких условиях. Есть и другие системы растворителей, также довольно успешно использовавшиеся; это 0,24 М ацетат калия (pH 6,5) в смеси хлороформ/метанол (1:2, о/о), содержащей 8% воды и 1% бензола [43], смеси хлороформ/метанол с разным соотношением компонентов [44], градиент 10—60% 12 мМ HCl, этанол/н-бутанол (4:1, о/о) в 12 мМ HCl [45] с добавлением ДМСО до 1% в конце градиента.

Исходя из общих эмпирических соображений, можно рекомендовать сначала проводить фракционирование белков и пептидов на сефадексе LH-60 и LH-20, а затем объединенные фракции, содержащие пептиды близкой молекулярной массы, подвергать хроматографии с обращенной фазой, как это описано выше. Высушивание пептидов и белков следует проводить с осторожностью на ротаторном испарителе до влажного состояния образца с последующим удалением остатков растворителя лиофилизацией. Чтобы облегчить повторное растворение и/или дезагрегацию, можно внести в сухой образец небольшой объем (100 мкл) безводную ТФУ перед добавлением основного растворителя.

3.4. Аффинная хроматография

Этот метод позволяет проводить очистку, основываясь на биологическом родстве или активности, которыми обладают лишь определенные компоненты в разделяемой смеси белков и пептидов. Мембраносвязанные ферменты, например, могут адсорбироваться на нерастворимых носителях, с которыми ковалентно связаны аналоги субстрата, простетические группы или

специфические эффекторы. Рецепторы связываются с иммобилизованными фармакологическими препаратами или гормонами. Ясно, что для успешной реализации этого подхода необходимо солиubilизировать мембраны в таких условиях, чтобы исследуемый белок сохранил свою биологическую активность. Адсорбированный белок обычно снимают с носителя с помощью агента, который эффективно конкурирует с иммобилизованным лигандом за центр связывания. Этим методом можно как концентрировать, так и очищать белок. Полное описание теории и практики аффинной хроматографии дано в одной из книг этой серии [46]. Здесь мы уделим внимание главным образом ее применению для фракционирования мембранных белков и пептидов.

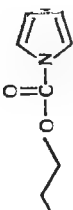
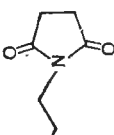
3.4.1. Носители

В качестве неподвижного носителя можно использовать целый ряд материалов — декстраны, целлюлозу, силикагели, стекло и синтетические смолы, однако наиболее эффективными оказались сефароза, агароза, полиакриламид и, по последним данным, полистирол. При выборе геля с необходимой пористостью следует принимать во внимание прежде всего размер образующегося комплекса белок — лиганд. При этом нужно иметь в виду, что рецепторный белок может состоять из нескольких субъединиц и что связывание детергента приводит к значительному увеличению размеров солиubilизированного белка. Носители активируют так, чтобы они приобрели способность ковалентно связывать специфический лиганд. Часто удобнее начать с имеющихся в продаже разнообразных активированных сорбентов (предлагаемых, например, фирмами Beckman, Bio-Rad, Calbiochem, Pharmacia, Pierce). Они имеют различные реакционно-способные функциональные группы, связанные с гелем либо непосредственно, либо через удлинительный мостик (спейсер) (см. табл. 6.1). Эти мостики повышают доступность иммобилизованного лиганда для белка и уменьшают стерические ограничения, что особенно важно для растворов, содержащих детергенты. Правда, иногда наличие таких удлинительных мостиков приводит к усилению неспецифических взаимодействий. Можно надеяться, что в будущем аффинные носители найдут еще более широкое применение при фракционировании белков методами ВЭЖХ и СЖХБ.

3.4.2. Лиганды

Практически во всех случаях лиганд связывают с носителем через первичные amino-, карбокси- и сульфгидрильные группы. Из табл. 6.1 видно, что все небольшие лиганды и белки, имеющие подходящие функциональные группы, можно ковалентно

Таблица 6.1. Аффинные носители и их специфичность

Носитель/функциональная группа	Специфичность лиганда	Ковалентная сшивка	Ссылки
Сефароза/CNBr-активированная	—NH ₂	Самопроизвольная реакция	[7]
1) Агароза 	—NH ₂	»	[186]
2) Агароза 	—NH ₂	»	[187]
2) Агароза 	—NH ₂	Катализ водорастворимым карбодинимидом	[188]
2) Агароза 	—COOH	»	[188]
2) Полиакриламид 	—COOH	»	[190]

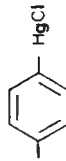
1), 2) Агароза
(Тиольный носитель может
иметь защитную группу)



[191]

Может потребоваться активация сульфгидрильным реагентом

1), 2) Арагоза



или

[192]

»

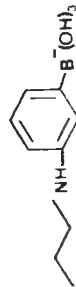
2) Полиакриламид



[193]

»

1) Полистирол



[194]

»

1) Фирма Pierce,
2) Фирма Bio-Rad.

пришить к носителю. В некоторых случаях необходимую активную группу можно специально ввести в лиганд или белок (см. раздел, посвященный модификации белка, а также табл. 6.4 и 6.5). Выбор носителя обычно определяется структурой и свойствами лиганда.

Есть еще ряд соображений, которые необходимо иметь в виду, когда в качестве лигандов используют белки. Во-первых, при ковалентном связывании белка с носителем следует позаботиться о сохранении активности белка. Для этого на стадии связывания часто требуется присутствие субстрата, аналога, простетической группы или каких-либо ионов, необходимых для проявления функциональной активности. Возможно, эти компоненты придется добавить и при подготовке аффинного сорбента для хроматографии. Во-вторых, непрореагировавшие активные группы следует блокировать каким-либо инертным модификатором (например, этаноламином) до использования аффинного сорбента. Аминокислоты в качестве блокирующих агентов менее предпочтительны, поскольку они придают носителю ионообменные свойства. В-третьих, кроме центров специфического связывания белки имеют также более обширные области, которые могут действовать как центры гидрофобного взаимодействия или — что более обычно — как ионообменники. Присутствие детергента часто приводит к маскировке или заполнению гидрофобных полостей в белковой молекуле, благодаря чему неспецифические гидрофобные взаимодействия ослабляются. Чтобы ослабить неспецифические ионные взаимодействия, бывает полезно включить в буфер хлорид натрия (в концентрации, например, 0,1 М).

Именно таким способом обычно готовят высокоспецифические аффинные сорбенты, содержащие пептидные гормоны или антибиотики (гл. 4). Однако на самом деле эти сорбенты имеют ряд недостатков; наиболее серьезные из них — это малая емкость, слабая аффинность и жесткие условия (например, низкие pH), которые часто необходимы для элюирования связавшихся белков. Поэтому обычно их стараются использовать на более поздних стадиях очистки. А на начальных этапах фракционирования с успехом применяют хроматографию на сорбентах, содержащих углеводсвязывающие белки — *лектины*, которые очень легко пришиваются к носителю и сохраняют свою активность в присутствии мягких детергентов [47, 48] (см. обзор [49]).

Благодаря специфичности к разным сахарам лектины можно использовать для фракционирования гликопротеинов [48, 50], но чаще они связывают одновременно несколько углеводсодержащих мембранных компонентов (обзор по лектинам и их специфичности см. в работе [51]). Хотя связавшиеся гликопро-

тепны легко элюируются с помощью разных сахаров, способность одного и того же углевода взаимодействовать с несколькими лектинами предполагает, что их специфичность не очень строгая. Выход белка при элюировании, как правило, весьма высок ($>90\%$), особенно когда работают с лектинами из *Lens culinaris*. В то же время конканавалин А, по общему мнению, наименее эффективен в этом отношении [47, 48, 52]. Вследствие вариабельности углеводных боковых цепей многих мембранных гликопротеинов индивидуальные лектины могут связывать только часть из всех разновидностей данного белка [48]. Этот недостаток можно отчасти преодолеть, используя лектины со сходной, но достаточно широкой специфичностью. Другой прием, который оказывается полезным, когда исследуемый белок содержит концевые остатки сиаловой кислоты, состоит в использовании сравнительно слабо специфичного лектина или смеси лектинов (например, смеси лектинов из *Lens culinaris* или агглютиниона из проростков пшеницы), что позволяет связать большую часть мембранных гликопротеинов. Несвязавшиеся сиалосодержащие белки обрабатывают затем нейраминидазой (разд. 6.1.2), чтобы экспонировать новые концевые углеводные остатки, которые в свою очередь можно использовать для связывания с аффинным носителем [53]. Наконец, по не совсем понятным причинам небольшие углеводсодержащие пептиды часто не связываются аффинными лектиновыми сорбентами, даже если исходные белки дают хорошее связывание.

Альтернативный вариант основан на неспецифическом связывании углеводсодержащих белков на двух боронатных сорбентах (табл. 6.1) с последующим элюированием буфером, содержащим сорбитол, цитрат или ацетат либо, за неимением лучшего, растворами с низкими рН (например, 25 мМ HCl, 100 мМ муравьиной кислотой). Этот подход сравнительно нов и пока мало использовался для мембранных белков.

3.4.3. Практические рекомендации

Образцы следует наносить на колонку, содержащую аффинный сорбент (например, 10—20 мл упакованного сорбента), при низкой скорости потока (2—3 мл/ч), чтобы условия взаимодействия были максимально близки к равновесным. При повышенных температурах (20—35 °C) связывание может усилиться. В некоторых случаях бывает полезно сразу после нанесения образца на какое-то время совсем приостановить проток буфера через колонку. После этого носитель следует промыть 5—10 объемами буфера, равными объему колонки, чтобы удалить несвязавшиеся или слабо связавшиеся компоненты. На этом этапе можно повысить ионную силу буфера для ослабления не-

специфического связывания. Элюирующий буфер пропускают через колонку до тех пор, пока какой-либо параметр (например, оптическая плотность при 280 нм) не достигнет фонового уровня. Это показывает, что носитель уже достаточно промыт. Элюирование специфически связавшихся компонентов обычно происходит быстро; они выходят в виде асимметричного пика с крутым передним фронтом и растянутым хвостовым участком. Попытки улучшить разделение путем введения градиента сахара при элюировании с лектиновых сорбентов не дали ощутимых результатов. Если образец наносят на колонку при повышенной температуре (20—30 °C), то элюирование часто облегчается при снижении температуры до 4 °C.

После промывания концентрированными солевыми растворами сорбент можно хранить в течение 1—2 лет в растворе, содержащем ингибиторы протеаз, антибактериальные агенты, а также субстраты или его аналоги. Перед использованием сорбенты тщательно промывают буфером (до 100 собственных объемов), в котором предполагается наносить образец. Иногда до уравнивания сорбента с буфером его промывают 0,01 %-ным ДСН, но эта операция приемлема лишь в том случае, если ковалентно связанный на носителе белок устойчив по отношению к ДСН или легко ренатурирует после удаления последнего. Имейте в виду, что при смешивании ДСН с растворами, содержащими ионы калия, или с детергентом типа додецилтриметиламмонийбромида происходит выпадение осадка.

4. Гель-электрофорез

Современные методы рекомбинантных ДНК и определения первичной структуры белков в некоторых случаях избавили исследователей от необходимости проводить очистку белка классическими методами. Если изучаемый белок удастся идентифицировать в условиях одномерного или двумерного электрофореза, его можно элюировать с геля в условиях, при которых возможно последующее определение аминокислотного состава и частичной аминокислотной последовательности. В одной из книг этой серии [54] детально описаны теория и практика гель-электрофореза. Для мембранных белков предложены системы, содержащие неденатурирующие детергенты, например тритон X-100 [55] и дезоксихолат [56], однако при этом часто не удается достичь высокого разрешения. Интересные перспективы в этом отношении открывает метод электрофореза со сдвигом заряда (см. Приложение V). Денатурирующие детергенты находят широкое применение в электрофоретических исследованиях, особенно при проведении электрофореза в полиакриламидном геле. Чаще всего используют додецилсульфаты натрия и лития, обладающие высокой солюбилизующей способностью

[57]. Хлоральгидрат, в принципе тоже очень полезный агент [58], использовать все же не стоит из-за его токсичности, особенно при тех высоких концентрациях, которые здесь необходимы.

Как правило, количество ДСН, добавляемого к мембранному препарату, должно по крайней мере в два раза превышать общий сухой вес препарата, так чтобы концентрация ДСН сохранялась на уровне 1% или выше. рН буфера можно менять в широких пределах (обычно от 5 до 9). Часто к смеси добавляют восстанавливающие реагенты. Наш опыт работы с меркаптоэтанолом показывает, что при используемых высоких концентрациях (1—5%) он может индуцировать протеолиз. Поэтому предпочтение следует отдавать дитиотреитолу, который можно брать в низких концентрациях (2 мМ). Присутствие сахарозы и глицерола на стадии солиubilизации мембран также не является обязательным, но их можно ввести в буфер, применяемый для нанесения образца на гель. После солиubilизации образец можно сразу подвергнуть электрофоретическому разделению или сначала проинкубировать при различных температурах (например, в течение 60—90 мин при 20—30 °C), чтобы дезагрегировать белок до мономерного состояния. Образец можно также прокипятить в течение 3 мин, главным образом для того, чтобы разрушить протеазы. Однако при этом следует проявлять большую осторожность, поскольку некоторые мембранные белки, например родопсин, а также β -адренэргический, мускариновый и никотиновый рецепторы, агрегируют при кипячении. Протеолиз при солиubilизации может представлять серьезную проблему, поскольку денатурированные мембранные белки являются прекрасными субстратами для протеаз, которые обычно устойчивы к ДСН и могут даже активироваться в процессе растворения мембран. Учитывая это обстоятельство, лучше сразу же готовить мембраны в буфере, содержащем один или несколько протеазных ингибиторов (см. приложение I). Если же необходимы дополнительные меры предосторожности, то имеет смысл вместе с ДСН добавить еще ФМСФ (1 мМ) и ЭДТА (10 мМ). Перед электрофорезом образец можно сконцентрировать лиофилизацией, ультрафильтрацией (в концентраторах типа Amicon Centricron) или осаждением 50—90%-ным ацетоном (впрочем, последнее не рекомендуется, поскольку это затрудняет ресолюбилизацию белка до мономерного состояния).

4.1. Извлечение белка из геля

После электрофореза белки можно обнаружить в геле с помощью целого ряда методов. Поскольку предполагается дальнейшее исследование белков (например, определение их

Таблица 6.2. Электроэлюция белков из полиакриламидного геля после электрофореза в присутствия ДСН

Оборудование/Реагенты

1. Плоскостонная камера, обычно используемая для разделения ДНК, или модифицированный прибор для гель-электрофореза в трубках (см. рис. 6.1).
2. Трубки для диализа, прокипяченные в течение 15 мин в 0,1 М бикарбонате натрия с 20 мМ ЭДТА, затем тщательно промытые дистиллированной водой. Для небольших белков и пептидов рекомендуется использовать трубки типа Spectropor.
3. Окрашивающий раствор кумасси: 0,1%-ный раствор (в/о) красителя кумасси ярко-синего в 50%-ном (о/о) водном метаноле, содержащем 7%-ную (о/о) уксусную кислоту. Раствор для отмывания красителя имеет тот же состав, но не содержит красителя.

Методика

1. Быстро (за 5—10 мин) окрашивают гель кумасси синим, затем выдерживают в отмывающем растворе до тех пор, пока не проявятся полосы белка (10—15 мин). Время окрашивания и отмывания должно быть как можно меньше, чтобы гарантировать максимальный выход белка при его последующей экстракции.
2. Вырезают полосы геля с пептидами, представляющими интерес. Гель не разрушают и не гомогенизируют.
3. Наполняют камеру буфером, содержащим 25 мМ трис-глицин (рН 8,5) и 0,1%-ный ДСН; 50 мМ трис-ацетат (рН 7,8) и 0,1%-ный ДСН или 0,1 М фосфат натрия (рН 7,8) и 0,10%-ный ДСН, до уровня примерно на 1 см выше платформы. При необходимости к буферу можно добавить 2-меркаптоэтанол (0,1%, о/о) или дитиотреитол (2—5 мМ). Чтобы гарантировать полное растворение белков, концентрацию ДСН можно повысить до 1% (в/о).
4. Отрезают кусок диализной трубки такой длины, чтобы в него вместился образец геля и осталось еще по 2 см с каждого края. Зажимают трубку с одного конца с помощью зажима типа Mediclip и заполняют ее буфером из камеры. Помещают вырезанный образец геля в трубку и осторожно выдавливают из нее большую часть жидкости, а затем закрывают сверху. Следует принять меры, чтобы исключить попадание в мешочек пузырьков воздуха.
5. Закрепляют диализный мешочек на платформе электрофоретической камеры. Подгоняют уровень буфера так, чтобы он покрывал мешочек.
6. Проводят электрофорез в течение 3—20 ч при напряжении 25—100 В и силе постоянного тока 20—150 мА, затем меняют направление тока примерно на 30 с, чтобы электрофоретически десорбировать белок с поверхности диализной мембраны. Если окрашивание геля и отмывание красителя проводили в течение длительного времени, то соответственно больше времени потребуются и на электроэлюцию.
7. Вынимают образец геля из мешочка. Прокрашивают его еще раз, чтобы убедиться в полном вымывании белка. Все частички геля, которые могут остаться, следует полностью удалить. При необходимости раствор можно слить и быстро отцентрифугировать или отфильтровать для удаления всех твердых примесей. Мешочек снова закрывают и диализуют раствор белка против по меньшей мере пяти смен дистиллированной воды (каждая смена по 5 л) в течение 2—3 сут при 0—4 °С. В диализующий раствор можно добавить ДСН до концентрации 0,25% (в/о), чтобы сохранить белок в растворенном состоянии, но последний диализ следует проводить только против дистиллированной воды. Краситель кумасси все время остается связанным с белком, благодаря чему можно контролировать ход электроэлюции.

Модификации

Эту методику можно использовать при любом способе окрашивания геля и с любым прибором для вертикального электрофореза в трубках, где диализный мешочек можно закрепить за нижний край трубки (см. рис. 6.1).

аминокислотной последовательности), рекомендуется использовать кумасси синий R, ацетат натрия или KCl [59—61], а также обратимо связывающиеся флуоресцентные метки [62]. Такие реагенты, как дансилхлорид, флуорескамин, *о*-фталевый альдегид, или реагенты, применяющиеся в методике окрашивания геля солями серебра или при обнаружении гликопротеинов, использовать не рекомендуется — все они необратимо модифицируют белок по аминок группам. Наиболее предпочтительны те процедуры, при которых белок можно идентифицировать с помощью специальных лигандов (радиоактивных, флуоресцентных и т. п.), которые были заранее ковалентно связаны с белком путем модификации ограниченного числа остатков (например, Cys, Tyr), а также специфических антител, меченных ^{125}I , или лектинов. Наиболее эффективная методика извлечения белка из геля — электроэлюция с диализом — описана в табл. 6.2. Весьма полезным может оказаться и обычный диализ. Оба метода пригодны и в случае высушенных, а затем регидратированных гелей, но выход белка при этом будет ниже. Судя по нашему опыту, методики, предусматривающие разрушение или растворение геля, дают препараты неудовлетворительного качества либо из-за внесения загрязнений, либо за счет необратимой модификации или деградации белка.

После извлечения белка может понадобиться удалить ДСН. Для этого используют либо специальные сорбенты для связывания детергента [64—67], либо его осаждение [60, 68], либо простой диализ в течение длительного времени (5 сут) с несколькими сменами буфера. В большинстве случаев некоторое количество ДСН оставляют (хотя бы для того, чтобы белок продолжал находиться в растворе). Для вытеснения остаточного количества ДСН обычно добавляют в большом избытке другие детергенты, а в некоторых случаях и денатурирующие агенты — 2—8 М мочевины или 2—6 М гуанидингидрохлорид. Самый эффективный способ удаления следов детергента включает использование органического растворителя (например, смеси FASE) с последующей гель-фильтрацией на сефадексе LH-60 или LH-20 (разд. 3.2.2).

5. Анализ мембранных белков

После очистки белка можно применить все обычные аналитические методы изучения его структуры — установить аминокислотный состав, определить N- и C-концевые остатки, содер-

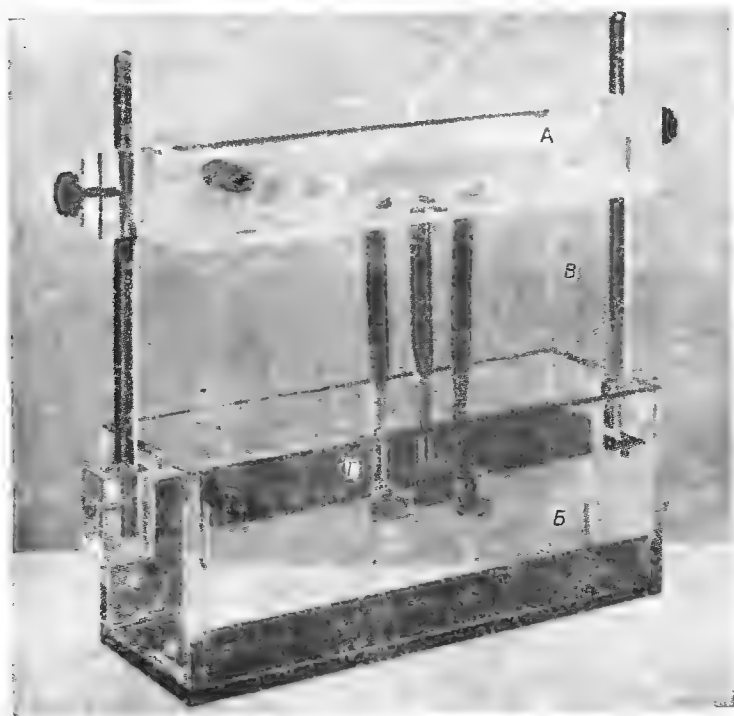


Рис. 6.1. Аппарат для электрофоретической экстракции белков из полнакриламидных гелей [63]. Он состоит из верхнего резервуара А, положение которого можно менять по высоте, и нижнего резервуара Б. В оба резервуара помещено по кусочку платиновой проволоочки, подсоединенной к электрическому разъему для подведения напряжения. Циркуляция буфера между резервуарами осуществляется с помощью перистальтического насоса; трубка для перекачки буфера обозначена на рисунке буквой В. Можно проводить экстракцию до 18 образцов геля одновременно (два ряда по девять отверстий). Здесь показаны три образца; они помещены в пипетки емкостью 10 мл, срезанные на высоте, отвечающей 5 мл. Остальные отверстия закрыты пластиковыми центрифужными пробирками. Верхняя часть пипетки (предварительно промытой кислотой) герметично закрыта кусочками целлофановой диализной пленки, прижатой резиновым колечком. Белки подвергают электроэлюции (при напряжении 50 В в течение 12—18 ч) в отрезке диализной трубки Г, закрепленном с помощью резинового колечка на кончике пипетки и герметизированном снизу с помощью зажима Mediclip (Spectrum Medical Industries Inc., 60916 Terminal Annex, Los Angeles, CA 90054). Примерно такую же систему можно собрать на основе прибора для кругового электрофореза (Medina, Findlay, неопубликованные данные). Очень полезно изготовить стеклянные трубки так, чтобы они имели небольшие канавки в своей верхней и нижней частях, предназначенные для резиновых колечек, что обеспечивает более надежную герметизацию соединений.

жание углеводов, первичную структуру и т. д. Но прежде всего надо позаботиться, чтобы белок находился в солюбилизированной, неагрегированной форме. Это особенно важно, когда проводится его ферментативное расщепление. Общие методы анализа белков детально описаны в другой книге данной серии [69]. Но есть целый ряд важных моментов, которые необходимо при этом иметь в виду.

5.1. Расщепление белка

Очистка пептидов, получаемых из интегральных мембранных белков, крайне затруднена из-за их повышенной склонности к агрегации и плохой растворимости в большинстве водных систем. В детергентах они находятся в мицеллах преимущественно в виде смеси, а не как отдельные мономерные формы и этим отличаются от интактного белка или его крупных фрагментов. Возможности применения различных хроматографических методик с использованием органических растворителей ограничиваются тем, что для растворения пептидов часто необходимы крайние значения pH.

С учетом всего этого часто расщепляют полипептиды в два приема. Сначала проводят гидролиз белка в мембране или в солюбилизованном детергентом состоянии. При этом расщеплению подвергается только очень небольшое число пептидных связей. Лучше всего, чтобы белок оставался в нативном состоянии, причем оптимальным окружением для него является липидный бислой. Выбор протеазы определяется прежде всего природой исследуемого белка. Хорошие результаты были получены с протеазой из *Staphylococcus aureus* V8, которая расщепляет белок по остаткам глутаминовой кислоты, находящимся на его С-концевом участке [22], в следующих условиях:

- а) 50—100 мМ фосфатный буфер pH 7,0;
- б) 1 мг/мл мембранного белка (в мембране или в детергенте);
- в) протеаза V8 в концентрации до 2% (в/в);
- г) 25—37°C, время инкубации до 6 ч.

Эти условия можно несколько изменить, чтобы добиться эффективного расщепления только по нескольким точкам. Фермент можно использовать даже при концентрациях ДСН порядка 0,1—1,0%. Среди других протеаз следует упомянуть также трипсин, химотрипсин, термолизин и эндопротеазы Lys-C и Arg-C, инкубацию с которыми можно проводить в фосфатном или бикарбонатном буфере при pH 7,0—8,0. Образующиеся при этом крупные фрагменты можно разделить хроматографированием в органических растворителях или электрофорезом в ПААГ с ДСН. Если используется последний метод, ча-

сто бывает полезно провести предварительный электрофорез в течение нескольких часов, чтобы удалить агенты, которые могут блокировать N-конец, но это нередко приводит к уширению белковых полос. Добавление тиогликолевой кислоты (до 1%) в рабочий буфер помогает защитить остатки метионина. Более глубокое расщепление осуществляют такие ферменты, как проназа, субтилизин и папаин. Расщепление этими ферментами в сочетании с электрофорезом в полиакриламидном геле можно с успехом использовать для получения пептидных карт [70, 71].

Второй этап фрагментации включает дальнейшее расщепление очищенных крупных полипептидных фрагментов с целью получения смесей пептидов, более простых, чем при расщеплении самого белка. На этой стадии протеолиз часто не доходит до конца из-за плохой растворимости фрагментов или их склонности к агрегации, а также из-за денатурирующего действия растворителя. Более эффективным может оказаться химическое расщепление, особенно по остаткам метионина с помощью бромциана (CNBr). Ниже описана простая методика проведения такого расщепления.

1. Растворяют белок/пептид в 70%-ной муравьиной кислоте или ТФУ (последняя более предпочтительна при расщеплении связей Met-Thr и Met-Ser, но, с другой стороны, она способствует окислению остатков триптофана [4]).

2. Добавляют 50—100-кратный избыток (по числу молей) CNBr по отношению к метионину (имейте в виду, что CNBr разлагается с образованием очень токсичных цианидов, поэтому все операции с ним, включая взвешивание и проведение реакций, необходимо осуществлять в вытяжном шкафу).

3. Проводят инкубацию в атмосфере N_2 в темноте при 20—25°C при осторожном перемешивании в течение 24 ч.

4. Упаривают на роторном испарителе почти досуха.

5. Добавляют воду и лиофилизуют.

Может оказаться полезным и химическое расщепление по остаткам триптофана с помощью *o*-иодозобензойной кислоты в присутствии тирозина [72] или BNPS-скатола [73], по связям аспарагин — глицин с помощью гидроксилamina [74] и в меньшей степени по остаткам цистеина с помощью 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислоты [75]. Образовавшиеся при этом пептиды можно очистить в органических и/или кислотных растворителях с помощью гель-фильтрации, хроматографии с обращенной фазой (см. выше), а иногда с помощью аффинных сорбентов, способных взаимодействовать с SH-группами.

5.2. Определение концентрации белка

Присутствие детергентов и фосфолипидов в сочетании с малыми количествами белка может значительно затруднить определение его концентрации. В табл. 6.3 перечислены те методы, которые можно использовать для этой цели. К сожалению, ни один из них нельзя признать совершенным и рекомендовать для повсеместного применения; и все же мы считаем, что наиболее надежными являются методы с использованием флуорескамина (фирменное название Flugam, фирма Roche) [76] и нингидрина (в ручном варианте) [77], и особенно те подходы, которые основаны на результатах аминокислотного анализа. В последнем случае необходимо иметь соответствующее оборудование (что становится все более проблематичным) и квалифицированных специалистов. Однако ручной нингидриновый метод, хотя и требующий значительных затрат труда и времени, если анализируется большое число образцов, тем не менее является довольно чувствительным, надежным и применим к трудным в работе белкам и пептидам, т. е. таким, которые удается растворить только в смесях органических растворителей. Очень полезны также методы Бредфорд [78], ВСА (фирма Pierce) и микро-Лоури [79]; они несложны и обладают такой же чувствительностью, как и метод с применением флуорескамина. Как правило, в качестве стандарта используется сывороточный альбумин, хотя при этом возможны и некоторые отклонения от обычных количественных соотношений.

5.2.1. Флуорескамин

1. Добавляют к образцу 0,2 М борат натрия с рН 9,0—9,5 (в случае белков) или 8,0—9,0 (в случае пептидов), так чтобы объем смеси составил около 2 мл, а концентрация буфера была не менее 0,1 М.

2. Добавляют 0,5 мл раствора флуорескамина в ацетоне (0,2 мг/мл); тщательно перемешивают.

3. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре и затем измеряют флуоресценцию при 480 нм; длина волны возбуждающего света 390 нм.

4. Чувствительность можно повысить, если провести гидролиз белка/пептида с помощью NaOH (см. ниже ручной нингидриновый метод), нейтрализовать смесь уксусной кислотой и затем добавить боратный буфер до рН 9,0.

5.2.2. Микрометод Лоури [80]

1. К 200 мкл раствора белка в детергенте добавляют 1 мл свежеприготовленного реагента Лоури (по 1 мл 2,0%-ного тартрата натрия/калия и 1%-ного CuSO_4 в 100 мл 0,1 н

Таблица 6.3. Методы количественного определения белка

Метод	Пределы измерения	Пояснения
Поглощение при 280 нм	0,1—3 мг	Мешают определению ароматические заместители и некоторые УФ-поглощающие детергенты, например тритоны. В целом метод дает грубую оценку.
Поглощение при 212 нм	1 мкг — 1 мг	Основан на УФ-поглощении пептидной группы, поэтому чувствителен и дает сравнительно стабильные результаты. Но они могут значительно искажаться, например, в присутствии кислот.
Биуретовый микрометод	0,1—1 мг	Основан на реакции с участием пептидных групп, поэтому слабо зависит от состава белка. В присутствии детергента реакционная смесь мутнеет; для устранения этого эффекта можно добавить 1,2-пропандиол [82].
Метод Бредфорд	1—100 мкг	Несколько зависит от состава белка, поскольку основан на реакции с участием аминогрупп. Детергенты могут мешать определению. В некоторых случаях более чувствительны и практически приемлемы модификации этого метода [83].
Реакция с [3H]-дансилхлоридом	0,1—1 мкг	Реагент взаимодействует с аминами, фенолами, тиолами и имидазолами. Метод чувствителен, но отличается длительной и сложной процедурой анализа. Некоторые детергенты могут мешать анализу [84].
Реакция с флуорескаминол	0,1—50 мкг	Наблюдается флуоресценция при реакции с первичными аминами в щелочных условиях. Метод сравнительно мало чувствителен к посторонним примесям; он довольно прост и требует мало времени.
Микрометод Лоури	1—50 мкг	Несколько зависит от природы белка. Детергенты, мешающие определению, можно солюбилизовать ДСН [79].
Реакция с нингидрином	1—50 мкг	Не зависит от природы белка, так как белки расщепляются до аминокислот. Определению может мешать высокое содержание детергентов. Требуется много времени [77].
Метод ВСА (Pierce)	0,5—50 мкг	Очень чувствителен, удобен и сравнительно мало чувствителен к присутствию посторонних веществ.

NaOH, содержащего 2% Na_2CO_3), тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин.

2. Добавляют 10%-ный ДСН до конечной концентрации 1% и тщательно перемешивают.

3. Добавляют 100 мкл разбавленного в два раза реагента Фолина — Чикольте и сразу же перемешивают.

4. Не раньше, чем через 30 мин и не позднее, чем через 2 ч, измеряют оптическую плотность при 660 нм.

5.2.3. Микрометод Лоури В [81]

Поскольку не все детергенты растворяются в ДСН (например, ЦТАБ), можно использовать альтернативную процедуру, включающую осаждение белка.

1. Добавляют 30 мкл 1%-ного раствора дезоксихолата к раствору белка (25 мкг в 5—200 мкл).

2. Добавляют 1 мл холодной 12%-ной трихлоруксусной кислоты.

3. Инкубируют 10 мин. Центрифугируют при 1000g в течение 20 мин.

4. Добавляют 1 мл реагента Лоури к осадку и солюбилизируют (10—15 мин).

5. Добавляют 100 мкл разбавленного в два раза реагента Фолина — Чикольте и сразу же перемешивают.

6. Через 30 мин измеряют оптическую плотность при 660 нм.

5.2.4. Ручной нингидриновый метод

1. Высушивают образец в полипропиленовых пробирках.

2. Добавляют 0,15 мл 9 М NaOH и инкубируют 90 мин при 110°C.

3. Осторожно добавляют 0,25 мл ледяной уксусной кислоты, пока образцы еще остаются теплыми.

4. Добавляют 0,5 мл свежеприготовленного нингидринового реагента (2 г нингидрина, 40 мг SnCl_2 в 75 мл 2-метоксиэтанола и 25 мл 4 М ацетата, pH 5,5, при продувании N_2) и инкубируют при 100°C в течение 15—20 мин.

5. Охлаждают, добавляют этанол до 2,5 мл и измеряют оптическую плотность при 570 нм.

6. Ковалентная модификация белков

Ковалентную модификацию боковых цепей отдельных аминокислотных остатков можно использовать для того, чтобы облегчить очистку тех мембранных белков, которые не удается пометить специфическими лигандами, или для того, чтобы изу-

чить топографическое расположение полипептидной цепи в мембране. Многие из тех реагентов, которые были предложены для водорастворимых белков, можно использовать и для интегральных мембранных белков. В табл. 6.4 и 6.5 приведен длинный, но все же неполный список соответствующих реагентов; перечислены главным образом те вещества, которые использовались для изучения мембран и легко доступны или могут быть получены несложным химическим синтезом. Характерным примером того, как такие реагенты (и протеазы) можно использовать для характеристики топографии мембранных белков, является исследование родопсина (см. обзор [85]). В Приложении IV содержится список перспективных реагентов, которые могли бы использоваться для изучения мембран, но пока не нашли применения в таких исследованиях.

6.1. Реагенты, модифицирующие поверхностные белки

Во многих мембранных исследованиях очень важно предотвратить проникновение или транспорт модифицирующего реагента через мембрану. Реагент считается проникающим, если доказано или есть основания полагать, что он способен внедряться в мембранный бислой или проходить через него. Однако во многих случаях изучаемые биологические системы обладают свойствами, предотвращающими такое проникновение. Кроме того (например, при использовании ангидридов), реакционная способность модифицирующего реагента может быть настолько велика, что он будет либо быстро инактивироваться в воде, либо вступать в реакцию с функциональными группами фосфолипидных молекул. Проводя модификацию при низких температурах (0—4 °C), можно ингибировать транспортные системы или снизить их активность. В конечном счете многие модифицирующие реагенты можно считать практически непроникающими через мембрану. Тем не менее, чтобы не было сомнений в достоверности полученных данных, в конце модификации перед проведением остальных операций рекомендуется инактивировать модифицирующий реагент и удалить как можно большую его часть промыванием. Поскольку нековалентное связывание с поверхностью мембраны может оказаться довольно прочным, часто бывает полезно включить в отмывающий буфер белок, который способен связывать реагент (например, БСА в концентрации 1 мг/мл).

6.1.1. Иодирование

Использование ^{125}I в качестве радиоактивной метки оказалось особенно успешным благодаря легкости ее детектирования (γ -излучение), высокой удельной радиоактивности и довольно большому периоду полураспада (60 сут). ^{125}I можно вводить

в белок прямым иодированием тирозиновых остатков или путем присоединения остатков, содержащих иод в качестве заместителя, к боковым цепям ряда аминокислот. Самой мягкой является методика иодирования с использованием фермента лактопероксидазы.

1. *Лактопероксидаза* [109, 110]. Этот фермент катализирует включение иодид-ионов в *мета*-положение бензольного кольца тирозинового остатка в ходе реакции, зависящей от перекиси водорода. В присутствии H_2O_2 в высокой концентрации быстро образуется молекулярный иод и происходит ингибирование фермента. Поскольку I_2 способен иодировать как липиды, так и белки и легко проникает через бислой, вопрос о том, находится ли присоединившаяся метка только на поверхности мембраны, остается неясным. Эта неопределенность в значительной мере снимается при включении в реакционную смесь глюкозооксидазы, которая продуцирует H_2O_2 из глюкозы примерно с такой же скоростью, с какой она потребляется лактопероксидазой (т. е. за все время реакции H_2O_2 не будет присутствовать в избытке). Полагают, что иммобилизация лактопероксидазы на каком-либо нерастворимом носителе дает возможность проводить модификацию только на поверхности мембраны. В простейшем варианте используют гранулы, на которых одновременно иммобилизованы как лактопероксидаза, так и глюкозооксидаза (Enzymobeads — Biograd). I_2 может образовываться также из I^- под действием пероксидаз, содержащихся в белках. Поэтому часто бывает необходимо ставить контрольный опыт без добавления лактопероксидазы.

Методика

1. Смешивают компоненты так, чтобы их конечная концентрация составляла: 200 мМ фосфатный буфер с pH 7,2 (или забуференный фосфатом физиологический раствор, буфер PBS), мембранная (клеточная) суспензия — не более 1 мг белка на 1 мл, 20 мМ β -D-глюкоза, 1 мКи $Na[^{125}I]$ без носителя. *Присутствие азидов и тиолов должно быть исключено, поскольку они ингибируют иодирование.*

2. На каждые 100 мкл инкубационной смеси добавляют 50 мкл препарата Enzymobeads или 2 мкг лактопероксидазы в смеси с 1 ед. глюкозооксидазы.

3. Инкубируют 10—30 мин при 4—25 °C.

4. Промывают мембраны (клетки) три раза фосфатным буфером.

5. Осаждают гранулы центрифугированием (100 g, 10 мин). Перед центрифугированием мембраны можно растворить в детергенте.

6. О степени неспецифической модификации можно судить, измеряя содержание ^{125}I в экстрагированных липидах (гл. 3).

Таблица 6.4. Реагенты для химической модификации мембран

Амнокислота	Проникающие реагенты	Непроникающие реагенты	Реакции/условия/пояснения	Ссылки
Цистеин	Уксусный ангидрид	Бром-, хлор- и иодуксусная кислота/ацетамид	См. другие ангидриды, упомянутые в случае лизина. Максимальная специфичность наблюдается при pH 8,5; можно использовать любой подходящий буфер с концентрацией не более 10 mM, 30—60 мин, 4—30 °C. Наиболее активны гидролизные	[86]
	Дансил- и дабсил-хлориды	<i>l</i> -Хлормеркурибензоат или бензолсульфокислота	Связываются ковалентно и обратимо, медленно проникают. Буфер (pH 7,0) с концентрацией не более 1 mM, 20—30 °C, до 3 ч	[87]
	N-этил- и фенилmaleимиды		Флуоресцируют, применяются в виде дисперсии в липидных везикулах; 0,1 M фосфат, 0,15 M сахараза, pH 9,0, 4 °C, до 3 ч	[88]
			Буфер (pH 7,0—8,0) с концентрацией не более 1 mM, 20—37 °C, до 1 ч. Могут реагировать с His и Lys в экстремальных условиях	[89]
		3,5-Диоксид-4-диазо-бензолсульфокислота	См. разд. 6.1.1	[90]
Глутаминовая кислота	NAP-таурин (см. также табл. 6.5)	Не проникает при 0 °C	Буфер (pH 7,0—8,0) с концентрацией не более 1 mM, 0—20 °C, до 30 мин	[91, 92]
Глутамин	Карбодиимиды	Некоторые водорастворимые формы	pH 4,5—7,0, 20—30 °C, до 1 ч	[93, 94]
		Трансглутаминаза	Катализирует включение меченых аминокислотных соединений, например [¹⁴ C]-путресцина. pH 7,4, 25—37 °C, до 18 ч	[95]

Гистидин	Дансил- и дабсил-хлориды Иод	3,5-Динод-4-диазабензол-сульфокислота	Как для цистина См. разд. 6.1.1 Как для цистина	[96, 97]
Лизин	Метил- и этилацетимидаты Ангидриды уксусной и янтарной кислот	Холин- и изетионилацетимидаты 3-Азидо-2,7-нафталиндисульфонат (см. табл. 6.5) 3,5-Динод-4-диазабензол-сульфокислота	pH 8,0, 1—10 mM, 20—30 °C, до 2 ч Практически не проникают из-за высокой реакционной способности. pH 7,0—7,5, добавляют порциями до 1 mM, 4—25 °C, 10—60 мин pH 6,0—8,0, до 1 mM, 4—37 °C, до 1 ч См. разд. 6.1.1.	[90, 98] [99] [90]
	Дансил- и дабсил-хлориды 1-фтор-2,4-динитробензол (реактив Сэнгера)	N-Формилметионилсульфонметилфосфат (^{32}S -FMPp) N-Гидроксисукцинимидбиотин и иминобиотин, сульфосукцинимидбиотин	Как для цистина, более легко метятся аминоксигруппы pH 8,0—9,0, до 10 mM, 20—30 °C, 1—3 ч. Реагирует также с остатками цистина и тирозина pH 9,5—10,0, 50 мкM, 20—30 °C, 10—30 мин	[100] [101]
	Диметиламиноазобензол- и фенилизотиопанаты	4-Ацетамидо-4'-изотиопанан- и 4,4'-динизотиопанан-2,2'-стильбендисульфонаты (SITS и DIDS)	Вводит свободный биотиновый остаток, что облегчает очистку на авидинодержавших аффинных носителях. Можно вводить стабильную группу и расщепляемые связи; pH 8,0, 1 mM, 4 °C, 2 ч pH 7,0—8,0, до 1 mM; 4—30 °C, до 1 ч. Проявляют специфичность по отношению к аннон-транспортирующему белку эритроцитов	[102] Pierce [103, 104]

Аминокислота	Проникающие реагенты	Непроникающие реагенты	Реакции/условия/пояснения	Ссылки
Тирозин (—OH)	N-Сукцинимидил-пропионат и его 3-(4-гидроксифенил)-, 3-(4-гидрокси-5-иодфенил)- и 3-(4-гидрокс-3,5-диидофенил)-производные (реактент Болтона и Хантера)	Пиридоксальфосфат вместе с $\text{NaB}[\text{H}]_4$ N-Гидроксисукцинимидный эфир трет-бутоксн-L-[^{35}S]-метионина ($[\text{R}^{\text{S}}\text{S}]\text{LR}$) Сульфосукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)-пропионат (водорастворимый реагент Болтона и Хантера)	pH 7,5, до 1 mM, 4—25 °C, до 30 мин pH 6—9 (гидролизуется при щелочных pH) мкM (10—100-кратный избыток по отношению к NH_2 -группам), 0—30 °C, 10—30 мин (см. табл. 6.7). Широко используется для ^{35}S -подписывания белков (см. разд. 6.1.1)	[105] Amer-sham [106] [107]
		Сульфосукцинимидилат 2,4,6-Тринитробензолсульфокислота	Используют так же, как в случае сукцинимидных эфиров (табл. 6.7) pH 8,0—9,0, до 1 mM, 20—40 °C, до 24 ч Как в случае лизина	Pierce [108]
		3,5-Диид-4-диазобензолсульфокислота	Как в случае лизина	
	Свободный под	Иодирование с помощью иодогена, иодобидса, лактопероксидазы n-Нитробензолсульфонилхлорид	См. разд. 6.1.1 pH 7,0—8,0, 1 mM, 25 °C, 30 мин	

Таблица 6.5. Универсальные фоточувствительные модифицирующие реагенты

Проникающие	Непроникающие	λ_{max} /пояснения/ссылки
Адмантандиазирин	3-Азидо-(2,7)-нафталин-дисульфонат	337—372 нм [118]
1-Азидо-4-иодбензол		260 нм [119—122]
1-Азидо-5-иоднафталин		310 нм [122]
5-Азидо-1-нафталин		319, 382 нм, 0,1—1 мМ, pH 7—8, 4—30 °C [99]
12-(4-Азидо-2-нитрофенокси)стеарилглюкозамин		1—2 М, обладает слабым детергентным действием [123]
N-(4-Азидо-2-нитрофенил)-2-аминоэтилсульфонат (NAP-таурин)	Диазотрифториды (имеются также проникающие аналоги) 3,5-Диод-4-азидобензолсульфокислота	Проницаемость мембран можно значительно снизить при 0—4 °C, 0,1—1 мМ, может проявлять детергентоподобные свойства [91, 92]
5-(4-Азидо-2-нитрофенил) [³⁵ S]тиофенол		395 нм [129]
Диазофлуорен		[124, 125]
Гексанонлдино-N-(4-азидо-2-нитрофенил)-тирамин		[126]
Пирен-1-сульфуриазид		460 нм [129]
3-Трифторметил-3-(м-иодфенил)диазирин		355 нм [130]
		Диазонизомер является инертным, 353 нм [127, 128]

II. *1,3,4,6-Тетрахлор-3,6-дифенилгликурин*. (Более ранние ссылки см. в [111].) Этот реагент (иодоген; Pierce) эффективно катализирует иодирование белков за счет окисления I⁻. Он нерастворим в воде и обычно наносится в виде пленки на стенки реакционного сосуда. С другой стороны, иодоген гидрофобен, и в принципе может проникать через бислой. Поэтому он менее удобен в качестве векторного зонда по сравнению с другими модификаторами.

Методика

1. Смачивают внутреннюю поверхность стеклянного сосуда раствором иодогена в хлороформе (1 мг/мл) и упаривают растворитель в вакууме или в потоке азота.

2. Добавляют мембраны (1 мг по белку), суспендированные в 1 мл PBS, pH 7,4, и 1 мКи Na^{[125]I} (1 мкг реагента приходится на 10 мкг белка).

3. Инкубируют при 4—25 °С в течение 5—30 мин, периодически осторожно перемешивая.

4. Останавливают реакцию удалением мембран и промыванием буфером, содержащим 1 мг/мл БСА.

III. *Иммобилизованный хлорамин Т* [112]. Метод иодирования остатков тирозина с помощью хлорамина Т является очень эффективным, но в то же время и довольно жестким. Наиболее нежелательные действия этой обработки можно ослабить, используя гранулы Iodo-Beads (крупные полистирольные гранулы, модифицированные N-хлорбензолсульфонамидом; Pierce). Таким путем удастся достичь вполне удовлетворительной векторной модификации. Этот реагент можно использовать в присутствии азиды, тогда как 2-меркаптоэтанол сильно подавляет его активность. Для проведения реакции рекомендуются следующие условия:

5—500 мкг белка на гранулу;

0,1—0,2 М фосфатный буфер, pH 7,0—7,4 (трис-буфер действует как слабый ингибитор);

1 мКи Na^{[125]I};

общий объем — до 1 мл на гранулу;

инкубация при 4—25 °С в течение 10—30 мин.

IV. *3,5-Диод-4-дiazобензолсульфонат (ДДИС)*. При модификации по методикам, описанным в разд. I—III, иодируются в основном остатки тирозина. Может оказаться, что число таких остатков ограничено или модификация тирозина приводит к утрате биологической активности. В таких случаях можно использовать агенты с более широкой специфичностью [110]. Очень полезным здесь является реагент ДДИС, который реагирует с остатками лизина, гистидина, цистеина, а также тирозина, причем условия реакции легко модифицировать так, чтобы обеспечить сохранение функциональной активности белка.

Условия проведения реакции (см. [90] и цитированную там литературу):

мембраны в концентрации до 2 мг белка в 1 мл;

0,1—0,2 М фосфат натрия, pH 7,4;

до 1 мМ ^{[125]I}-ДДИС (5 Ки/моль), что отвечает примерно

100-кратному избытку по отношению к белку;

инкубация при 4—25 °С в течение 5—30 мин.

Реакцию можно остановить, добавив в большом избытке (в 100 раз, например, 10 мМ) гистидин и отмыв мембраны от детергента центрифугированием и ресуспендированием в фосфатном буфере.

V. N - Сукцинимидил - 3(4 - гидроксифенил)пропионат [106, 107]. Это соединение (реагент Болтона и Хантера) или его водорастворимое сульфированное производное (Pierce) можно приобрести в йодированной форме или йодировать самим с помощью хлорамина Т (Amersham). Он ковалентно присоединяется по аминогруппам через сукцинимидную сложноэфирную группировку в мягких условиях (например, фосфатный буфер, pH 7,0—7,5, 10—100-кратный избыток, инкубация при 0—30°C в течение 10—30 мин), необратимо йодируя при этом белки (см. табл. 6.4 и 6.7). Однако йодирование может сопровождаться значительной модификацией белка, поэтому следует тщательно контролировать условия реакции, чтобы сохранить его биологическую активность.

6.1.2. Углеводы клеточной поверхности

Если модификация полипептидной цепи белков клеточной поверхности нежелательна, то с помощью существующих методов можно ввести метку в их углеводные боковые цепи. Для этого лучше всего использовать галактозооксидазу. Она окисляет концевые остатки галактозы до соответствующего 6-альдегида, после восстановления которого посредством $\text{NaB}[\text{H}]_4$ регенерируют исходную галактозу, но уже содержащую тритиевую метку [114]. Некоторые исследователи предпочитают использовать $\text{KB}[\text{H}]_4$ из-за его большей устойчивости при хранении.

1. В 1 мл буфера PBS (pH 7,4) инкубируют мембраны (клетки) в количестве 1 мг с 10—20 ед. галактозооксидазы при 25—37°C при осторожном перемешивании.

2. Промывают мембраны (клетки) три раза тем же буфером, используя такие условия центрифугирования, которые не разрушают клетки.

3. Ресуспенсируют мембраны (клетки) в фосфатном буфере, добавляют 1 мКи $\text{NaB}[\text{H}]_4$, растворенного в 10 мМ NaOH, и инкубируют при 25°C в течение 30 мин при осторожном перемешивании.

4. Осаждают центрифугированием и ресуспенсируют, как описано выше.

Необходимо провести контрольную инкубацию в отсутствие галактозооксидазы, поскольку $\text{NaB}[\text{H}]_4$ может модифицировать некоторые боковые заместители полипептидной цепи (например, сульфгидрильные группы).

Концевые остатки галактозы в углеводной цепи можно заново получить или увеличить их число с помощью предварительной обработки нейраминидазой (1 ед. в условиях, описанных выше). С другой стороны, остатки самой сиаловой кисло-

ты можно пометить путем обработки мембран боргидридом после предварительного воздействия на них 1—2 мМ метапериодатом натрия в фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 5—10 мин при 0—20 °С [115, 116]. Реакцию окисления останавливают добавлением глицерола (100 мМ) в буфере, мембраны промывают и восстанавливают [^3H]-боргидридом, как описано выше.

6.2. Гидрофобные реагенты

Реагенты этого класса (табл. 6.5; обзор [117]) были специально предложены для изучения мембран. Цель состояла в том, чтобы включить неактивный реагент в бислой и уже затем получить из него реакционноспособные частицы, которые будут вступать в реакцию только с теми компонентами, которые находятся внутри мембраны. Обычно такой реагент активируют облучением, однако при этом следует позаботиться о том, чтобы не нарушить функциональную активность мембран. Поэтому предпочитают проводить облучение светом с длиной волны >300 нм. Наиболее важными характеристиками реагентов этого типа являются гидрофобность и реакционная способность. Поскольку во многих случаях задача состоит в том, чтобы специфично пометить и по возможности идентифицировать боковые цепи аминокислот, находящиеся в контакте с углеводородной фазой бислоя, то для предотвращения связывания метки с поверхностью мембраны в водную среду часто добавляют вещества, улавливающие реакционноспособные частицы. Наиболее эффективны в этом отношении тиолсодержащие соединения, такие, как цистеин и восстановленный глутатион. Однако их применение иногда приводит к тому, что получаемая информация оказывается неполной, поскольку эти вещества-ловушки могут конкурентным образом предотвратить мечение той области мембраны, которую занимают полярные головки фосфолипидных молекул.

Недавние исследования показали, что азиды и диазирины (являющиеся предшественниками нитренов и карбенов соответственно) из-за различий в своей реакционной способности дают информацию разного рода. Продукты активации менее реакционноспособных азидов (табл. 6.5) атакуют преимущественно нуклеофильные группы, в особенности остаток цистенина и тирозина (возможно, также метионина) и в меньшей степени остатки триптофана, лизина и гистидина [120, 121]. Их способность реагировать с углеводородными боковыми цепями очень ограничена. С другой стороны, продукты активации диазиринов хотя и реагируют предпочтительно с нуклеофильными остатками, вступают в реакцию также и с углеводородами [128].

Поэтому указанные реагенты, и особенно 3-трифторметил-3-(*m*-иодфенил)диазириин (ТИД), лучше всего подходят для неизбирательного введения меток в мембрану [127]. В тех случаях, когда мечение настолько интенсивно, что при секвенировании белка из-за высокого фона затрудняется однозначная идентификация включения метки, лучше для проведения модификации использовать азиды.

При активации УФ-светом азиды и диазирины разлагаются с образованием в качестве активных частиц соответственно нитренов и карбенов. При этом образуется ряд продуктов — азирины и диазопроизводные, иногда тоже достаточно реакционноспособные (в случае реагента ТИД это не так). Поскольку многие из активированных промежуточных продуктов имеют повышенную гидрофильность и сравнительно большое время жизни, не исключена их диффузия к поверхности мембраны. Для ее предотвращения можно проводить фотоактивацию ниже температуры фазового перехода липидов. Однако охлаждать образец следует очень быстро, чтобы не произошла агрегация белка [120, 121]. Описание типичной методики приведено в табл. 6.6. Чтобы ознакомиться с ее различными вариациями, имеет смысл просмотреть приведенные ссылки. Рекомендуемые в них контрольные опыты могут оказаться чрезвычайно полезными.

6.3. Амфифильные реагенты

Эта группа включает такие реагенты, как 12-(4-азидо-2-нитрофенокси)стеароилглюкозамин [123], который встраивается в бислой так, что его сахарный остаток находится у поверхности мембраны. Если мембраны замкнуты, то реагенты этого типа, как полагают, сначала находятся только в наружном монослое мембраны, но со временем они переходят (правда, довольно медленно) в ее внутренний слой. Следует позаботиться о том, чтобы реагенты такого типа не проявляли детергентных свойств.

В тех случаях, когда удастся провести реконструкцию мембран с исследуемым белком (или белками), определенные премисущества дает использование фосфолипидов, содержащих фотоактивируемые группировки в полярной головке [132], в остатке глицерола [132] или в жирнокислотных цепях [134—136]. Эти молекулы остаются мембраносвязанными (т. е. не переходят в водную фазу в заметном количестве), но не следует полагать, что положение fotocувствительной группы в бислое будет при этом оставаться строго определенным и статичным. Благодаря динамичности мембран эта группа может находиться в бислое на разной глубине. Поэтому использование

Таблица 6.6. Модификация фоточувствительными гидрофобными реагентами

1. Предварительно инкубируют мембраны (1—5 мг/мл по белку) в подходящем буфере (например, фосфатном или трис-НСl), содержащем, если необходимо, до 10 мМ вещества-ловушки. Инкубацию проводят при подходящей температуре (в интервале 4—37 °C) и в атмосфере азота. Желательно использовать для этого стеклянный сосуд (закрытый пробкой).
2. В темноте добавляют реагент, растворенный в смешивающемся с водой органическом растворителе (обычно этаноле), так чтобы конечная концентрация растворителя была менее 1% (или на том уровне, который не влияет на ход модификации и на функциональную активность белка/мембраны). Концентрация реагента должна быть в интервале от 10 мкМ до 1 мМ. С учетом коэффициента распределения реагента его концентрация в мембране будет по меньшей мере в 1000 раз выше, поэтому лучше брать реагент в низкой концентрации. Проводят инкубацию с реагентом в течение 10—30 мин.
3. Быстро замораживают образец в виде тонкой пленки путем введения его по каплям в стеклянный сосуд, охлаждаемый жидким азотом. Эта операция не обязательна; она имеет смысл, когда диффузия активных промежуточных продуктов к поверхности мембраны представляет реальную проблему.
4. Облучают образец в растворе или в замороженном состоянии в течение 1—90 мин в атмосфере азота. Время облучения выбирают так, чтобы получить требуемый уровень включения метки, но, с другой стороны, избежать повреждающего действия облучения на биологические структуры. (Помните, что стекло поглощает УФ-свет.) Можно использовать УФ-лампу, излучающую в достаточно широком диапазоне длин волн, но лучше подобрать такой источник, который испускает свет с длиной волны, отвечающей максимуму поглощения реагента. *Работать необходимо в защитных очках, поглощающих УФ-свет; время экспозиции должно быть по возможности минимально, облучение следует проводить в вытяжном шкафу или в хорошо проветриваемой комнате.* Продолжают инкубацию в темноте еще до 90 мин, чтобы в реакцию вступили все долгоживущие активные частицы. Это особенно важно, если модификация проводится при низкой температуре.
5. Тщательно промывают мембраны (после быстрого оттаивания, если оно необходимо) в буфере, содержащем до 1 мг/мл БСА, чтобы удалить нековалентно связанные продукты фотолиза. По другой схеме мембраны можно сразу же растворить в ДСН или в системе FACE [120, 121] и осадить белки 7—10 объемами холодного ацетона.
6. Важно включить в методику два контрольных опыта.
 - а. Образец мембран инкубируют с реагентом, *но не облучают, и затем проводят все операции в темноте.*
 - б. Образец мембран инкубируют в темноте с *предварительно облученным* реагентом (скажем, при его концентрации до 10 мМ) и затем проводят все операции в темноте.

Первый контрольный опыт позволяет учесть те взаимодействия, которые не обусловлены активными частицами. Второй дает возможность оценить степень модификации за счет образования долгоживущих частиц, причем в зависимости от того, как скоро после облучения реагент был добавлен к мембране, можно провести оценку времени жизни активных частиц.

таких реагентов как своеобразных мембранных «глубиномеров» является проблематичным. Фотоактивируемые аналоги фосфолипидов обычно включают в реконструируемые мембраны вместе с природными фосфолипидами в мольных отношениях от 1:10 до 1:1000. Ключевым моментом при этом является пра-

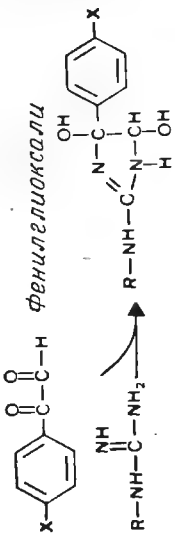
вильная ориентация белка в реконструированной мембране, соответствующей его нативной организации *in situ* (гл. 5). Особый интерес представляют амфифильные реагенты на основе модифицированных жирных кислот, которые могут включаться в мембрану в ходе биосинтеза *in vivo* [137].

6.4. Сшивающие реагенты

Один из наиболее распространенных подходов к выяснению молекулярной организации белков основан на использовании бифункциональных реагентов, которые могут ковалентно соединять друг с другом компоненты, находящиеся в достаточно длительном контакте за время эксперимента (общий обзор см. в [117, 138]). За последние годы число имеющихся реагентов такого типа существенно возросло, и сейчас имеется широкий выбор реагентов, различающихся по размеру, реакционной способности и природе активных группировок. Наиболее распространены реагенты трех видов: имидаты, N-гидроксисукцинимидные эфиры и их водорастворимые сульфонатные аналоги и фотоактивируемые арилазиды. Соединения, относящиеся к первым двум группам, реагируют почти исключительно с аминогруппами, тогда как модификаторы третьей группы имеют более широкую направленность и реагируют с любыми нуклеофилами. Некоторое применение нашли также активированные галогенсодержащие реагенты (например, иод- и бромацетильные производные) и малеимиды, особенно в тех случаях, когда речь шла о модификации тиольных групп. В табл. 6.7 перечислены различные модифицирующие реагенты и указана их специфичность. Бифункциональные группировки могут представлять собой комбинацию как двух одинаковых реакционно-способных групп (гомобифункциональные реагенты), так и разных групп (гетеробифункциональные реагенты). Они различаются по степени гидрофобности и по длине мостика, соединяющего между собой активные группировки. В определенных условиях эти мостики могут подвергаться разрыву. Имеющиеся в продаже реагенты можно найти в каталогах фирм Amersham, Calbiochem и Pierce.

Бифункциональные реагенты обычно хранят при -20°C в безводных условиях, поскольку многие из них химически неустойчивы в водной среде. Их можно добавлять к реакционной смеси в буфере, этаноле или диметилсульфоксиде. В конце эксперимента избыток реагента следует дезактивировать и удалить путем промывания мембран. Целью многих экспериментов является установление наиболее тесных контактов между отдельными белками, поэтому можно рекомендовать начинать исследование с реагентов, способствующих образованию дисуль-

Таблица 6.7. Сшивающие реагенты

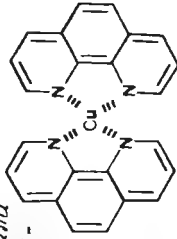
Специфичность	Реагенты/реакция	Пояснения/условия	Ссылки
Аргинин $\left(\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{—NH—C—NH}_2 \end{array} \right)$	 Фенилглиоксали	pH 7—8, но продукт разлагается при нейтральных или щелочных pH мм 30—60 мин 20—30 °C	[145, 146]
Аспарагиновая и глутаминовая кислоты (—COOH)	Карбодиймиды $\text{R—NH}_2 + \text{HOOC—R}_1 \longrightarrow \text{R—N—C(=O)—R}_1$	Катализируют образование пептидной связи с эндогенными и экзогенными аминосоединениями pH 4,5—7,0 мм 30—60 мин 20—30 °C	[147]
Глутамин $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—NH}_2 \end{array} \right)$	Катализируется транс-глутаминазой $\text{R—C(=O)—NH}_2 + \text{NH}_2\text{—R}_1 \longrightarrow \text{R—C(=O)—N—R}_1 + \text{NH}_3$	pH 7,4 25—37 °C 1—18 ч	[95, 148]

Цистеин



(-SH)

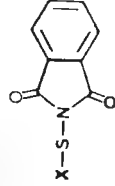
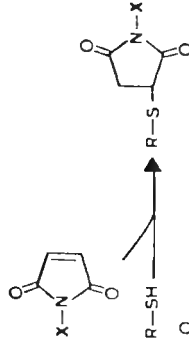
(свободная или образующая-ся при восстановлении)



Комплекс 1,10-фенантролина с медью



Малеимиды



Дает дисульфидные связи с тиоэфтальмидами

[156]

pH 7—9
мкМ—мМ
4—25 °C, до 2 ч

[119, 149]

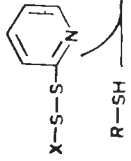
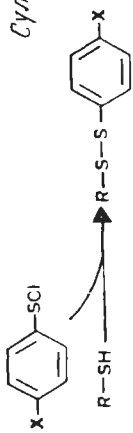
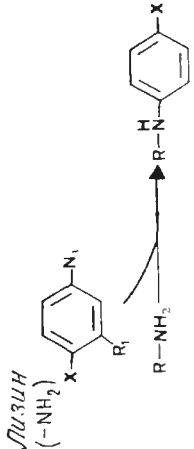
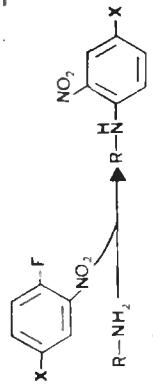
pH 7—9
До 100 мкМ фенантролина вместе с 10 мкМ CuSO_4 0—25 °C, 5—20 мин

Индуктирует образование дисульфидной связи из удобно расположенных сульфгидрильных групп. Реакцию останавливают с помощью 1 мМ ЭДТА

[150]

[151, 152]

pH 7—9
мкМ
0—40 °C
10—60 мин
В жестких условиях будет реагировать с лизинном и гистидином

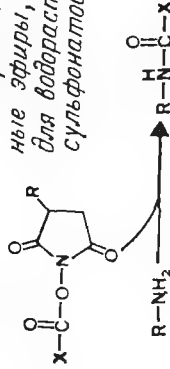
Специфичность	Реагенты/реакция	Пояснения/условия	Ссылки
	<i>Пиридилдисульфиды</i>	pH 8 мкМ 4—40 °C 1—18 ч	[153, 156]
	<i>Сульфенилгалогениды</i>	pH 8,0 мкМ 0—40 °C, 10 мин — 1 ч Синтез см. в [154] Реагирует также с остатками триптофана [155]	[151, 153]
<i>Лизин</i> (-NH₂) 	<i>Арилазиды</i> R₁-H, OH, NO₂	pH 7—9 мМ От —100 до +25 °C 10—60 мин Добавляют в темноте, облучают при >300 нм	[138, 152, 154—160]
	<i>Арилгалогениды</i>	pH 7—9 мкМ 0—40 °C Были также использованы для перекрестного сшивания фосфолипидов	[139, 162, 163]

Диазотрифториды

[125]

рН 7,0—8,0
мкМ
Облучают при 254 нм.
в течение 2 мин при
4 °С
Имеют широкую специ-
фичность, включая,
например, SH-группы

N-Гидроксисукцинимид-
ные эфиры, R = -SO₃Na
для водорастворимых
сульфонатов



[139, 164—169]

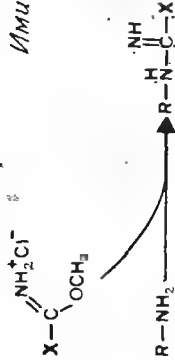
рН 6—9, гидролиз про-
ходит в некоторой
степени при щелочных
рН.
мкМ, избыток в 10—
100 раз по отношению
к аминогруппам.

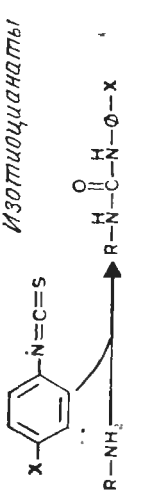
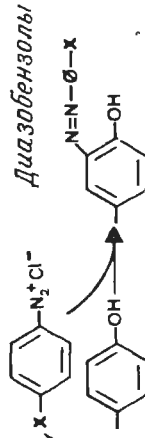
0—30 °С
10—30 мин
Добавляют в этаноле,
ацетоне или ДМСО.
Конечная концентра-
ция растворителя
должна быть не выше
1%. Синтез см. в [170]

[139, 168, 171]

рН 8—10, быстро гид-
ролизуются при ней-
тральных рН. мкМ или
по меньшей мере из-
быток в 100 раз по от-
ношению к аминио-
группам.
0—40 °С, немного бо-
лее активны при по-
вышенных температу-
рах.
10—60 мин

Имидаты.



Специфичность	Реагенты/реакция	Пояснения/условия	Ссылка
<i>Изотиоцианаты</i> 	<i>Тирозин / Гистидин</i>  <i>Диазобензолы</i>	pH 7—9, но нестабильны при щелочных pH. мкМ—мМ 0—50 °C 5—30 мин	[104]
<i>Неселективно</i>  <i>Трифтордизазирины</i>		pH 6—8 мкМ 0—37 °C, до 20 мин. Активируют облучением при 350 нм. Наибольшее сродство к пуктеофитам	[117]

фидных (Си-фенантролин) и пептидных (карбодимид, транс-глутаминаза) связей, или с реагентов с очень коротким расстоянием между активными функциональными группами (например, дифтординитробензол [139]). Результаты применения этих реагентов с цепью так называемой «нулевой длины» будут определять необходимость использования других сшивающих реагентов с более длинной и гибкой цепочкой и с разной специфичностью. В табл. 6.7 указаны условия, при которых можно применять эти реагенты.

6.4.1. Анализ ближайшего окружения белка

Если белок удастся идентифицировать методом электрофореза в ПААГ с ДСН, либо с помощью специфических меток (обычно ковалентного типа), либо благодаря тому, что он индивидуален или присутствует в мембране в смеси с немногими другими белками (как, например, родопсин [139] или белки миелина [140]), то для изучения его молекулярного окружения можно использовать сшивающие реагенты. Экспериментальные условия при этом такие же, как и в случае водорастворимых белков; они определяются главным образом свойствами сшивающего реагента (табл. 6.7). Однако, чтобы полученные результаты можно было однозначно трактовать, необходимо выполнить ряд контрольных экспериментов. Во-первых, имеет смысл использовать расщепляемые реагенты (например, содержащие дисульфидную связь), потому что возможность снова получить мономерные полипептиды поможет отличить сшивание от какой-либо неспецифической и необратимой агрегации, которая может произойти вследствие модификации боковых цепей аминокислот (табл. 6.8). Следует также провести контрольные опыты с инактивированным сшивающим реагентом или без него, а еще лучше — с близким ему по строению монофункциональным реагентом.

Во-вторых, надо иметь в виду, что локальная концентрация белка в мембране очень высока (так, при концентрации белка в инкубационной смеси 1 мг/мл его *эффективная* концентрация близка к 100 мг/мл). Поэтому частота хаотических столкновений белка с реагентом соответственно намного выше, что может привести к значительной неспецифической ассоциации, тем самым затрудняя интерпретацию результатов. Ситуацию можно несколько упростить, снизив значения трех переменных — концентрации сшивающего реагента (например, с величин порядка мМ до мкМ), времени инкубации (например, с 1 ч до 10 мин) и температуры. Степень понижения температуры, конечно, будет зависеть от активности функциональных групп, но есть определенные преимущества от быстрого снижения температуры

Таблица 6.8. Расщепляемые группировки в сшивающих реагентах

Группировка	Условия	Ссылки
Амидиновая $\begin{array}{c} \text{NH} \quad \text{H} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{N}-\text{R} \end{array}$	2 М метиламин pH 11,5 75%-ный ацетонитрил 3 ч 37 °C	[173]
Азо $-\text{N}=\text{N}-$	0,1 М дитионит натрия 0,15 М NaCl pH 8,0 30 мин 20—30 °C	[174]
Дисульфидная $-\text{S}-\text{S}-$	10 мМ дитиотрептол или 2-меркаптоэтанол pH 7,0—8,0 30 мин 4—30 °C	
Эфирная $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{O}- \end{array}$	1 М гидроксилламин pH 7—9 25 мМ CaCl ₂ 1 мМ бензамидин 3—6 ч 20—40 °C	[175]
Гликольная $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ -\text{CH}-\text{CH}- \end{array}$	15 мМ периодат натрия pH 7,5 (не трис-буфер) 4—5 ч 20—30 °C	[176]
Сульфоновая $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{S}- \\ \\ \text{O} \end{array}$	100 мМ NaH ₂ PO ₄ pH 11,5 6 М мочевины 2 мМ дитиотрептол 2 ч 37 °C	[177]

ниже 4 °C или по крайней мере ниже температуры фазового перехода фосфолипидов, благодаря чему можно добиться эффективного «замораживания» стационарного состояния мембраны.

Интерпретация экспериментов по сшиванию весьма трудна [141]. Чаще всего проводят анализ олигомерных форм белка, идентифицируемых при электрофорезе в ПААГ с ДСН. В тех случаях, когда применение более чем одного реагента указывает на образование димеров и тетрамеров в качестве преобладающих продуктов, вполне разумно сделать вывод о нативной димерной (или, возможно, тетрамерной) организации белка. Уменьшение в геометрической прогрессии содержания диме-

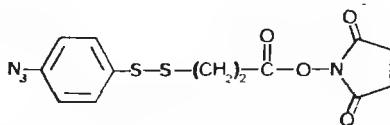
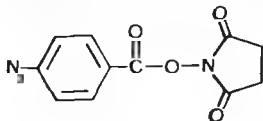
ров, тримеров, тетрамеров, пентамеров и т. д. чаще всего свидетельствует о мономерной организации белка или о существовании его в виде массивного агрегата. В том случае, когда единственный белок содержится в мембране в высокой концентрации, артефактные олигомерные структуры можно получить с каким-либо одним или двумя бифункциональными реагентами, поэтому важно проводить эксперименты не с одним, а с несколькими сшивающими реагентами.

Иногда сделанные выводы можно надежно подтвердить, если сначала растворить мембранный образец в детергенте, сохраняющем функциональную активность белка (и, как можно предположить, его структурную организацию), а потом добавить сшивающий реагент. В этих условиях эффективная концентрация белка и соответственно частота хаотических столкновений будут снижены, благодаря чему уменьшится и уровень его неспецифического, «фонового» сшивания [139].

6.4.2. Взаимодействия между лигандом и рецептором

Обработка сшивающими реагентами мембран, предварительно проинкубированных в равновесных условиях с радиоактивно меченым гормоном или другим лигандом, позволила успешно идентифицировать многие белки-рецепторы (см. обзор [142]). При этом экспериментальные условия в целом весьма сходны с теми, которые применяются при изучении ближайшего окружения белков (разд. 6.4.1), за исключением того, что соотношение рецептор/лиганд должно быть по возможности максимально высоким. При проведении этих экспериментов сталкиваются с теми же проблемами «фоновой» модификации, которые были рассмотрены выше, и поэтому была предложена другая схема постановки опытов. В этом случае белковый или гормональный лиганд предварительно метят фоточувствительным гетеробифункциональным реагентом. Если его способность реагировать с определенным рецептором существенно не нарушается, то модифицированный таким образом лиганд вводят в мембрану в темноте в концентрациях, достаточных для взаимодействия со специфическими высокоаффинными рецепторами. После достижения равновесного состояния образец подвергают УФ-облучению, которое активирует фоточувствительные азидные группировки. Хотя доля образовавшихся при этом сшивков между лигандом и рецептором значительно ниже (в лучшем случае 1—2%), чем обычно (20—25%), возросшая специфичность взаимодействия сильно облегчает интерпретацию полученных результатов. Таким образом можно также установить, какая субъединица в олигомерном рецепторе несет на себе центр связывания для белкового или гормонального лиганда.

Наиболее полезными для подобных экспериментов оказались бифункциональные реагенты — производные арилазидов и N-гидроксисукцинимидных эфиров. Некоторые из них содержали мостики — расщепляемые группировки [143, 144]. В качестве примера здесь приведены два таких реагента:



Ниже представлена типичная методика проведения экспериментов по изучению взаимодействий между лигандами и рецепторами.

1. Проводят иодирование белкового лиганда по методике, описанной в разд. 6.1.1. Иодированный белок, находящийся в растворе, следует отделить от других компонентов реакционной смеси центрифугированием или гель-фильтрацией.

Стадии (2) — (4) следует проводить в темноте!

2. Инкубируют [^{125}I]-лиганд (10—20 мкг) в атмосфере азота в растворе, содержащем 0,1 мМ бифункционального сшивающего реагента в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), в течение 10—30 мин при 4—25°C. Реакцию можно остановить с помощью 1 мМ лизина.

3. Очищают модифицированный [^{125}I]-лиганд гель-фильтрацией на небольшой колонке (например, с 2 мл сефадекса G-50) в буфере, подходящем для инкубации с мембранами (клетками).

Убедитесь в том, что константы связывания для модифицированного и немодифицированного лигандов существенно не различаются.

4.а. Добавляют модифицированный [^{125}I]-лиганд к мембранам в условиях, используемых при анализе рецепторного связывания (0—37°C), и оставляют до установления равновесия. В идеальном случае следует добавить столько лиганда, чтобы было занято около 50% рецепторных центров, а доля свободного лиганда составляла 60—70% от всего добавленного его количества. Этого можно достичь, когда величины K_d низки (от 10^{-8} до 10^{-9} М), а число рецепторов велико (пояснения см. в работе [117]). Если связывание является очень прочным,

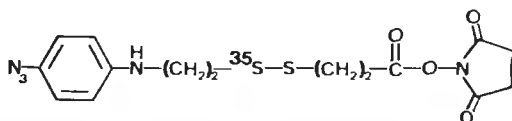
мембраны можно промыть, чтобы снизить уровень неспецифического связывания, но лучше всего провести контрольный опыт (б) для определения этого уровня.

- б. Проводят параллельную инкубацию, при которой вместе с иодированным лигандом добавляют также немеченый лиганд, но в большом избытке по отношению к меченому (по меньшей мере в 200 раз).

5. Облучают контрольный и опытный образцы в атмосфере азота УФ-светом (с помощью, например, ртутной лампы) в течение 1—10 мин при 4—25 °С. Реакцию можно остановить добавлением 1 мМ дитиотрептола. Промывают мембраны (клетки) подходящим буфером.

6. Наличие специфического рецепторного связывания устанавливают с помощью гель-электрофореза в присутствии ДСН, сравнивая состав меченых и немеченых белков, полученных в инкубациях (а) и (б).

В тех случаях, когда нельзя получить радиоактивно меченый лиганд, на стадиях 2—6 можно использовать меченые бифункциональные реагенты, например [цистеамин-³⁵S]-N-сукцинимидил-3-[(2-нитро-4-азидофенил)-2-аминоэтилдитио]пропионат ([³⁵S]-SNAP; фирма Amersham). Этот реагент позволяет идентифицировать не только перекрестно-сшитые комплексы, но и сам рецептор, который сохраняет метку после обработки комплекса дитиотрептолом, отрывающим лиганд от рецептора.



Другим реагентом такого типа является N-[4-(4'-азидо-3'-[¹²⁵I]-иодфенилазо)бензоил]-3-аминопропил-N-оксисукцинимидный эфир, предлагаемый фирмой New England Nuclear. Он расщепляется дитионитом натрия (табл. 6.8) и поэтому в отличие от реагента SNAP после расщепления не дает свободных SH-групп.

7. Радиационная инактивация

Оценки молекулярной массы мембранных белков, сделанные по результатам гель-фильтрации и анализа субъединичного состава, полезно дополнить данными, полученными с помощью методов, которые не требуют солиubilизации белка. Такую возможность предоставляет радиоинактивационный анализ, который в определенных случаях может быть единственным или

наилучшим способом определения молекулярной массы нативного белка (см. обзор [178]). Этот метод основан на инактивации белка (т. е. утрате его биологической активности) *in situ* под воздействием рентгеновского облучения. Инактивация зависит (обычно логарифмически) от общей дозы радиации. В свою очередь эта зависимость прямо связана с размерами мишени (т. е. с молекулярным объемом функционально активного белка). Простейшее соотношение имеет вид

$$\text{Молекулярная масса} = 6,4 \cdot \frac{10^{11}}{D},$$

где D — доза облучения в радах, при которой активность уменьшается до 37% от исходного уровня. Это уравнение получено эмпирически для экспериментов, проведенных при комнатной температуре. Однако мембраны рекомендуется исследовать в замороженном состоянии, поскольку их чувствительность к облучению резко возрастает по мере повышения температуры. В этих условиях обычно принято строить калибровочную кривую для молекулярной массы ряда известных белков в зависимости от их чувствительности к облучению. Данные для новых белков можно затем непосредственно сравнивать с этими стандартами. Такой подход хорошо оправдал себя в случае мономерных мембранных белков [179, 180] и оказался вполне удовлетворительным для олигомерных систем [181, 182]. Обычно полученные молекулярные массы отражают нативный молекулярный состав, хотя он не всегда отвечает размерам минимальной функциональной структуры. В некоторых случаях были получены размеры мишени, которые соответствуют только части изучаемого молекулярного комплекса [183]. По-видимому, это связано с отсутствием «общения» между субъединицами. Поэтому важно наряду с радиационной инактивацией использовать и другие методы исследования.

Радиационная инактивация может оказаться очень информативной при изучении индуцированной ассоциации, возникающей, например, при сопряжении рецептора с аденилатциклазой в присутствии гормона. В этом случае, оценивая молекулярную массу, можно отличить несопряженную циклазную систему от сопряженного комплекса, формирующегося в присутствии гормона [184]. Однако при этом еще более важно, чем раньше, подкрепить эти выводы независимыми исследованиями, поскольку в случае таких сложных ансамблей, как аденилатциклазная система, вероятность вариабельности в условиях постоянного равновесия необычайно велика [185]. Там, где это возможно, в конце эксперимента следует проводить электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН, чтобы оценить, какое действие оказала радиация на мембранные белки.

8. Заключение

Исследование интегральных мембранных белков все еще остается трудной задачей, требующей оригинальных подходов и нетривиальных решений; тем не менее каждый год появляются все новые сообщения о совершенствовании имеющейся методической базы. По-видимому, особого внимания здесь заслуживает разработка аппаратуры и технологии приготовления сорбентов для выделения гидрофобных белков и пептидов. В сочетании с современными эффективными методами модификации белков и определения их аминокислотной последовательности усовершенствование методов выделения позволяет надеяться на быстрый прогресс в познании химического строения белков, их молекулярной организации и локализации в мембранах.

Литература

1. Marchesi V. T., Steers E., Jr. (1968). *Science*, **159**, 203.
2. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. (1971). *Biochemistry*, **10**, 2606.
3. Tanner M. J. A., Gray W. R. (1971). *Biochem. J.*, **125**, 1109.
4. Steck T. L. (1972). *Biochim. Biophys. Acta*, **225**, 553.
5. Carter J. R., Jr. (1973). *Biochemistry*, **12**, 171.
6. Schiechl H. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 65.
7. Steck T. L., Yu J. (1973). *J. Supramol. Struct.*, **1**, 221.
8. James G. T. (1978). *Anal. Biochem.*, **86**, 574.
9. Bordier C. (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 1604.
10. Clemetson K. J., Bienz D., Zahno M.-L., Luscher E. F. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **778**, 463.
11. Mahar P. A., Singer S. J. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 958.
12. Pryde J. G. (1986). *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 160.
13. Folch J., Lees M., Stone-Stanley G. (1957). *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
14. DeRobertis E. (1975). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **73**, 11.
15. Altendorf K., Lukas M., Lohl B., Muller C., Sandermann H. (1977). *J. Supramol. Struct.*, **6**, 229.
16. Phizackerly P. J. R., Town M., Newman G. E. (1979). *Biochem. J.*, **183**, 731.
17. Altendorf K. (1977). *FEBS Lett.*, **73**, 271.
18. DeRobertis E., Fiszderde Plazas S., Llorente de Carlin C., Aguilar J., Schlieper P. (1978). *Adv. Pharmacol. Ther.*, **1**, 235.
19. Boyan-Salyers B., Vogel J., Riggan L., Summers F., Howell R. (1978). *Metab. Bone Dis. Rel. Res.*, **1**, 143.
20. Criado H., Aguilar J., DeRobertis E. (1980). *Anal. Biochem.*, **103**, 289.
21. Gerber G. E., Anderegg R. J., Herlihy W. C., Gray C. P., Biemann K., Khorana H. G. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 227.
22. Findlay J. B. C., Brett M., Pappin D. J. C. (1981). *Nature*, **293**, 314.
23. Brett M., Findlay J. B. C. (1983). *Biochem. J.*, **211**, 661.
24. Pappin D. J. C., Findlay J. B. C. (1984). *Biochem. J.*, **217**, 605.
25. Sigel E., Stephenson F. A., Mamalaki C., Barnard E. A. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 6965.
26. Fillingame R. (1976). *J. Biol. Chem.*, **251**, 6630.
27. Siebald W., Wachter E. (1980). *FEBS Lett.*, **122**, 307.
28. Welling G. W., Groen G., Welling-Webster S. (1983). *J. Chromatogr.*, **266**, 629.

29. Lundahl P., Greijer E., Lindblom H., Fagerstam L. G. (1984). *J. Chromatogr.*, **297**, 129.
30. McGregor J. L., Clezardin P. L., Manach M., Gronlund S., Dechavanne M. (1985). *J. Chromatogr.*, **326**, 179.
31. Engel W. D. S., Schagger H., Von Jagow G. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **592**, 211.
32. Aton B. R., Litman B. J., Jackson M. L. (1984). *Biochemistry*, **23**, 1737.
33. Gotti C., Conti-Tonconi B. M., Raftery M. A. (1982). *Biochemistry*, **21**, 3148.
34. Momoi N. Y., Lennon V. A. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 12757.
35. Hammonds R. G., Nicolas P., Li C. H. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6494.
36. Schneider W. J., Beisiegel U., Goldstein J. L., Brown M. S. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 2664.
37. Schmitt-Ullrich R., Wallach D. F. H. (1977). In: *Biological and Biomedical Applications of Isoelectric Focussing*. Catsimpoalas N., Drysdale J. (eds.), Plenum Press, New York, London, p. 191.
38. Lilley L., Eddy B., Schaber J., Fraser C. M., Venter J. C. (1984). In: *Receptor Biochemistry and Methodology*. Vol. 2 *Receptor Purification Procedures*. Venter J. C., Harrison L. C. (eds.), Alan R. Liss, New York, p. 77.
39. O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H. (1977). *Cell*, **12**, 1133.
40. Wakefield L. M., Cass A. E. G., Radda G. K. (1984). *J. Biochem. Biophys. Methods*, **9**, 331.
41. Aton B. R. (1986). *Biochemistry*, **25**, 677.
42. Khorana H. G., Gerber G. E., Herlihy W. C., Anderegg R. J., Gray C. P., Nihei K., Biemann K. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5046.
43. Blondin G. A. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 1087.
44. Tandy N. E., Dilley R. A., Hesmondson H. A., Bhatnagar D. (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 4301.
45. Van der Zee R., Welling-Webster S., Welling G. (1983). *J. Chromatogr.*, **266**, 577.
46. Dean P. D. G., Johnson W. S., Middle F. A., eds. (1985). *Affinity Chromatography — A Practical Approach*. IRL Press, Oxford and Washington, D. C.
47. Allan D., Auger J., Crumpton M. J. (1972). *Nature New Biol.*, **236**, 23.
48. Findlay J. B. C. (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 4398.
49. Lotan R., Nicolson G. L. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 329—376.
50. Kahane I., Furthmayer H., Marchesi V. T. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 464.
51. Goldstein I. J., Hayer C. E. (1978). *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **35**, 127.
52. Nachbar M. S., Oppenheim J. D., Aull F. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **419**, 512.
53. Carter W. G., Sharon N. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 570.
54. Hames B. D., Rickwood D. eds. (1981). *Gel Electrophoresis of Proteins — A Practical Approach*. IRL Press, Oxford and Washington DC.
55. Dewald B., Dulaney J. T., Touster O. (1974). *Methods Enzymol.*, **32**, 82.
56. Dulaney J. T., Touster O. (1970). *Biochim. Biophys. Acta*, **196**, 490.
57. Gershoni J. M., Palade G. E., Hawrot E., Klimowitz D. W., Leutz T. L. (1982). *J. Cell Biol.*, **95**, 422.
58. Griffin D. L., Landon M. (1981). *Biochem. J.*, **197**, 333.
59. Nelles L. P., Bamberg J. R. (1976). *Anal. Biochem.*, **73**, 522.
60. Hager D. A., Burgess R. R. (1980). *Anal. Biochem.*, **109**, 76.
61. Higgins R. C., Dahmus M. E. (1979). *Anal. Biochem.*, **93**, 257.
62. Aebersold R. H., Teplow D. B., Hood L. E., Kent S. B. H. (1986). *J. Biol. Chem.*, **261**, 4229.
63. Kelly C., Totty N. F., Waterfield M. D., Crumpton M. J. (1983). *Biochem. Int.*, **6**, 535.

64. Weber K., Kuter D. J. (1971). *J. Biol. Chem.*, **246**, 4504.
65. Lenard J. (1971). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 662.
66. Fox J. L., Stevens S. E., Taylor C. P., Poulser L. L. (1978). *Anal. Biochem.*, **87**, 253.
67. Kapp O. H., Vinogradov S. N. (1978). *Anal. Biochem.*, **91**, 230.
68. Henderson L. E., Oroszlan S., Konigsberg W. (1979). *Anal. Biochem.*, **93**, 153.
69. Findlay J. B. C., Geisow J. B. C., eds. (1987). *Protein Sequencing — A Practical Approach*. IRL Press, Oxford and Washington, DC in press.
70. Cleveland D. W., Fischer S. G., Kerschmer M. W., Laemmli U. K. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 1102.
71. Hudson T. H., Johnson G. L. (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 1459.
72. Mahoney W. C., Hermodson M. A. (1979). *Biochemistry*, **18**, 3810.
73. Hunziker P. E., Hughes G. J., Wilson K. J. (1980). *Biochem. J.*, **187**, 515.
74. Bornstein P., Balian G. (1977). *Methods Enzymol.*, **47**, 132.
75. Degani Y., Patchornik A. (1974). *Biochemistry*, **13**, 1.
76. Udenfriend S., Stein S., Bohlen P., Dairman W., Leingruber W., Weigle M. (1972). *Science*, **178**, 871—872.
77. Hirs C. H. W. (1967). *Methods Enzymol.*, **11**, 328.
78. Bradford M. M. (1976). *Anal. Biochem.*, **72**, 248.
79. Wang C.-S., Smith R. L. (1975). *Anal. Biochem.*, **63**, 414.
80. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. (1978). *Anal. Biochem.*, **87**, 206.
81. Bensadoun A., Weinstein D. (1976). *Anal. Biochem.*, **70**, 241.
82. Futterman S., Rollins M. H. (1973). *Anal. Biochem.*, **51**, 443.
83. Rubin R. W., Warren R. W. (1977). *Anal. Biochem.*, **83**, 773.
84. Schulz R. M., Wassarman P. M. (1977). *Anal. Biochem.*, **77**, 25.
85. Findlay J. B. C., Pappin D. J. C. (1986). *Biochem. J.*, **238**, 625.
86. Gurd F. (1972). *Methods Enzymol.*, **25**, 424.
87. Sutherland R. M., Rothstein A., Weed R. I. (1967). *J. Cell Physiol.*, **69**, 185.
88. Schmidt-Ullrich R., Knüfermann H., Wallach D. F. H. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 353.
89. Knauf P. A., Rothstein A. (1971). *J. Gen. Physiol.*, **58**, 211.
90. Barclay P. L., Findlay J. B. C. (1984). *Biochem. J.*, **220**, 75.
91. Staros J. V., Richards F. M. (1974). *Biochemistry*, **13**, 2720.
92. Mas M. T., Wang J. K., Hargrave P. A. (1980). *Biochemistry*, **19**, 684.
93. Solioz M. (1984). *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 309.
94. Carraway K. L., Koshland D. E. (1972). *Methods Enzymol.*, **25**, 616.
95. Pober J. S., Iwanij V., Reich E., Stryer L. (1978). *Biochemistry*, **17**, 2163.
96. Whiteley N. M., Berg H. C. (1974). *J. Mol. Biol.*, **87**, 541.
97. Nemes P. P., Miljamich G. P., White D. L., Dratz E. A. (1980). *Biochemistry*, **19**, 2067.
98. Carraway K. L., Kobylka D., Summer S. J., Carraway C. A. (1972). *Chem. Phys. Lipids*, **8**, 65.
99. Dockter M. E., Koseki T. (1983). *Biochemistry*, **22**, 3954.
100. Poensgen J., Passow H. (1971). *J. Membr. Biol.*, **6**, 210.
101. Bretscher M. (1971). *J. Mol. Biol.*, **58**, 775.
102. Zeheb R., Chang V., Orr G. A. (1983). *Anal. Biochem.*, **129**, 156.
103. Maddy A. H. (1964). *Biochim. Biophys. Acta*, **88**, 390.
104. Cabantchik Z. I., Rothstein A. (1974). *J. Membr. Biol.*, **15**, 227.
105. Rifkin D. B., Combans R. W., Reich R. (1972). *J. Biol. Chem.*, **247**, 6432.
106. Bolton A. E., Hunter W. M. (1973). *Biochem. J.*, **133**, 529.
107. Cicciamarra F., Rosen F. S., Merler E. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2081.
108. Gordesky S. E., Marinetti G. V., Love R. (1975). *J. Membr. Biol.*, **20**, 111.
109. Morrison M. (1974). *Methods Enzymol.*, **32(B)**, 103.

110. Hubbard A. L., Cohn Z. A. (1976). In: Biochemical Analysis of Membranes. Maddy A. H. (ed.), Chapman and Hall (London), p. 427.
111. Tuszyński G. P., Knight L. C., Kornecki E., Sridastava S. (1983). Anal. Biochem., **130**, 166.
112. Markwell M. A. K. (1983). Anal. Biochem., **125**, 427.
113. Luthra M. G., Friedman J. M., Sears D. S. (1978). J. Biol. Chem., **253**, 5647.
114. Morell A. G., Ashwell G. (1972). Methods Enzymol., **28**, 205.
115. Gahmberg C. G., Andersson L. C. (1977). J. Biol. Chem., **252**, 5888.
116. Hedo J. A., Kasuga M., Van Obberghen E., Roth J., Khan C. R. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 4791.
117. Bayley H. (1983). Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Work T. S., Burdon R. H. (eds.), Elsevier, Amsterdam, Vol. 12.
118. Bayley H., Knowles J. R. (1978). Biochemistry, **17**, 2414, 2420.
119. Wells E., Findlay J. B. C. (1980). Biochem. J., **187**, 719.
120. Davison M. D., Findlay J. B. C. (1986). Biochem. J., **234**, 413.
121. Davison M. D., Findlay J. B. C. (1986). Biochem. J., **236**, 389.
122. Tarrab-Hazdai R., Bercovici T., Goldfarb V., Gitler C. (1980). J. Biol. Chem., **255**, 1204.
123. Wisniewski B. J., Bramhall J. S. (1981). Nature, **289**, 319.
124. Anajanyulu P. S. R., Lala A. K. (1982). FEBS Lett., **146**, 165.
125. Casanova J., Horowitz Z. D., Copp R. P., McIntyre W. R., Pascual A., Somnells H. H. (1984). J. Biol. Chem., **259**, 2084.
126. Booth A. G., Kenny A. J. (1980). Biochem. J., **187**, 31.
127. Brunner J., Semenza G. (1981). Biochemistry, **20**, 7174.
128. Hoppe J., Brunner J., Jorgensen B. B. (1984). Biochemistry, **23**, 5610.
129. Cerletti N., Schatz G. (1979). J. Biol. Chem., **254**, 7746.
130. Sator J., Gonzalez-Ros J. M., Calvo-Fernandez P., Martinez-Carrion M. (1979). Biochemistry, **18**, 1200.
131. Hebdon G. M., Knott J. C. A., Green N. M. (1980). Biochemistry, **19**, 6216.
132. Ross A. H., Radhakrishnan R., Robson R. J., Khorana H. G. (1982). J. Biol. Chem., **257**, 4152.
133. Montecucco C., Bisson R., Dabbeni-Sala F., Pitotti A., Gutweniger H. (1980). J. Biol. Chem., **255**, 10040.
134. Brunner J., Richards F. M. (1980). J. Biol. Chem., **255**, 3319.
135. Robson R. J., Radhakrishnan R., Ross A. H., Takagaki Y., Khorana H. G. (1982). Lipid-Protein Interactions, **2**, 149.
136. Brunner J., Spiess M., Aggeler R., Huber P., Semenza G. (1983). Biochemistry, **22**, 3812.
137. Leblanc P., Capone J., Gerber E. G. (1982). J. Biol. Chem., **257**, 14586.
138. Ji T. H. (1983). Methods Enzymol., **91**, 580.
139. Brett M., Findlay J. B. C. (1979). Biochem. J., **179**, 215.
140. Harris R., Findlay J. B. C. (1983). Biochim. Biophys. Acta, **732**, 75.
141. Peters K., Richards F. M. (1977). Annu. Rev. Biochem., **46**, 523.
142. Massague J., Czech M. P. (1985). Methods Enzymol., **109**, 179.
143. Eberle A. N., DeGraan P. N. E. (1985). Methods Enzymol., **109**, 129.
144. Yip C. C., Yeung C. W. T. (1985). In: Methods Enzymol., **109**, 170.
145. Vanin E. F., Burkhard S. J., Kaiser I. I. (1981). FEBS Lett., **124**, 89.
146. Ngo T. T., Yan C. F., Lenhoff H. M., Ioy J. (1981). J. Biol. Chem., **256**, 11313.
147. Pennington R. M., Fisher R. R. (1981). J. Biol. Chem., **256**, 8963.
148. Dutton A., Singer S. J. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 2586.
149. Steck T. L., Ramos B., Strapazon E. (1976). Biochemistry, **15**, 1154.
150. Wells E., Findlay J. B. C. (1980). Biochem. J., **187**, 719.
151. Vanin E. F., Ji T. H. (1981). Biochemistry, **20**, 6754.
152. Moreland R. B., Smith P. K., Fujimoto E. K., Dockter M. E. (1982). Anal. Biochem., **121**, 321.
153. Kincaid R. L., Vaughan M. (1983). Biochemistry, **22**, 826.

154. Kiehm D. J., Ji T. H. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 8524.
155. Demoliou C. D., Epand R. H. (1980). *Biochemistry*, **19**, 4539.
156. Moreland R. B., Dockter M. E. (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 339.
157. Steiner M. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 861.
158. Goewert R. R., Landt H., McDonald J. M. (1982). *Biochemistry*, **21**, 5310.
159. Schmitt M., Painter R. G., Jesaitis A. J., Preissner K., Sklar L. A., Cochran C. G. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 649.
160. Zarleng D. A., Miskimen S. A., Fan D. P., Fujimoto E. K., Smith P. K. (1982). *J. Immunol.*, **128**, 251.
161. Jung S. M., Moroi M. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **761**, 152.
162. Marjey S. P., Tsai K. H. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 31.
163. Kornblatt J. A., Lake D. F. (1980). *Can. J. Biochem.*, **58**, 219.
164. Zarleng D. A., Watson A., Bach F. H. (1980). *J. Immunol.*, **124**, 913.
165. Staros J. V., Kakkad B. P. (1983). *J. Membr. Biol.*, **74**, 247.
166. Pilch P. F., Czech M. P. (1979). *J. Biol. Chem.*, **254**, 3375.
167. Sen I., Bull H. G., Sutter R. L. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1679.
168. Bragg P. D., Hon C. (1980). *Eur. J. Biochem.*, **106**, 495.
169. Laburthe M., Breant B., Ronyer-Fessard C. (1984). *Eur. J. Biochem.*, **139**, 181.
170. Giedroe D. P., Puett D., Ling W., Staros J. V. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 16.
171. Baskin L. S., Yang C. S. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **684**, 263.
172. Bender W. W., Garan H., Berg H. C. (1971). *J. Mol. Biol.*, **58**, 783.
173. Packman L. C., Perham R. (1982). *Biochemistry*, **21**, 5171.
174. Jaffe C. L., Lis H., Sharon N. (1980). *Biochemistry*, **19**, 4423.
175. Abella P. M., Smith P. K., Royer G. P. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 734.
176. Rinke J., Meinke M., Brimacombe R., Fink G., Rommel W., Fasold H. (1980). *J. Mol. Biol.*, **137**, 301.
177. Huang C. K., Richards F. M. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 5514.
178. Jung C. Y. (1984). In: *Receptor Biochemistry and Methodology*. Venter J. C., Harrison L. C. (eds.), Alan R. Liss, Vol. 3, p. 193.
179. Hughes S. M., Harper G., Brand H. D. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 56.
180. Sterr C. J., Kempner E. S., Ashwell G. (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 5851.
181. Saccomani G., Sachs G., Cupoletti J., Jung C. Y. (1981). *J. Biol. Chem.*, **256**, 7727.
182. Venter J. C. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 4842.
183. Fewtrell C., Kempner E., Poy G., Metzger H. (1981). *Biochemistry*, **20**, 6589.
184. Nielsen T. B., Lad P. M., Preston M. S., Kempner E., Schlegel W., Rodbell M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 772.
185. Simon P., Swillens S., Dumont J. E. (1982). *Biochem. J.*, **205**, 477.
186. Bethell G. S., Ayers J. S., Hancock W. S., Hearn M. T. W. (1979). *J. Biol. Chem.*, **254**, 2572.
187. Dufau M. L., Ryan D. W., Baukal A. J., Catt K. J. (1975). *J. Biol. Chem.*, **250**, 4822.
188. Brody R. S., Westheimer F. H. (1979). *J. Biol. Chem.*, **254**, 4238.
189. Merrill A. H., Jr., McCormick D. B. (1980). *Methods Enzymol.*, **66**, 28.
190. Lockshin A., Moran R. G., Danenberg P. V. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 750.
191. Carlsson J., Axen R., Unge T. (1975). *Eur. J. Biochem.*, **59**.
192. de Pinto V., Tommasino M., Valmieri F., Kadenbach B. (1982). *FEBS Lett.*, **148**, 103.
193. Davis C. W., Daly J. W. (1979). *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **5**, 65.
194. Garlick R. L., Mazer J. S. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 6142.

ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

К. Линдсей Башфорд

1. Введение

Оптическую спектроскопию, спектрофотометрию и флуориметрию можно использовать для наблюдения за происходящими в биологических мембранах процессами лишь при условии, что система содержит хромофоры, способные соответствующим образом реагировать на события, в которых они участвуют. Основная проблема в подобных экспериментах — не получение данных, а их интерпретация. Возможность такой интерпретации зависит от чистоты постановки эксперимента и удачного выбора хромофора. В этой главе мы рассмотрим некоторые проблемы, для решения которых можно использовать спектральные методы, и попытаемся дать полезные рекомендации по грамотной и аккуратной постановке эксперимента. Мы остановимся также на типичных примерах применения спектральных методов к системам, в изучении которых у нас уже имеется определенный опыт. В табл. 7.1 перечислен ряд мембранных систем, которые можно изучать с помощью флуориметрии и спектрофотометрии, и указано, какие из них мы детально рассмотрим ниже.

Обычно используют два типа хромофоров: эндогенные, или «внутренние» хромофоры, изначально присутствующие в мембране, и экзогенные, или «внешние», включаемые в систему экспериментатором. Среди хромофоров первого типа наиболее ценны пигменты, поглощающие свет в видимой области (400—700 нм); их довольно мало и они участвуют в весьма ограниченном круге мембранных процессов. Порфирины, флавины и каротиноиды имеют характерные спектры с узкими интенсивными полосами поглощения. И не случайно роль цитохромов в митохондриях была оценена уже в ранней работе Кейлина [1], выполненной с помощью простого спектроскопа на летательной мышце насекомых. Наиболее распространенные кофакторы, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, — пиридиннуклеотиды (NAD, NADP) и флавины — флуоресцируют либо в окисленном, либо в восстановленном состоянии. В фотосинтетических системах, помимо хлорофилла, роль «встроенных молекулярных вольтметров» играют еще и каро-

Таблица 7.1. Хромофоры, используемые для изучения структуры и функции биологических мембран

Хромофор	Способ измерения	Получаемая информация	Ссылки ¹⁾
<i>Эндогенные</i> Хлорофилл	Флуоресценция/ Поглощение	Механизм фото- синтеза	[49, 50] [2, 32]
Каротиноиды ²⁾ NADH	Поглощение Флуоресценция/ Поглощение		
Флавопротеины Цитохромы ²⁾	Флуоресценция Поглощение	Электронный транспорт	[14—16]
Гемоглобин ²⁾ Миоглобин ²⁾	» »	Транспорт O ₂ в тка- нях	[10, 25, 26, 30]
<i>Экзогенные</i> Акридины ²⁾	Флуоресценция	pH содержимого клеточных ком- партментов	[7, 51] [9]
Квен-1 ²⁾ Нейтральный красный ²⁾	Поглощение		[36, 52, 53]
Квин-2 ²⁾ Экворин, обелин	Флуоресценция Люминесценция	Содержание Ca ²⁺ в цитоплазме	[8] [54]
Мурексид, арсен- азо	Поглощение		[55]
Цианины Оксонолы ²⁾	Флуоресценция Флуоресценция/ Поглощение	Мембранный по- тенциал	[3, 13, 31]
Мероцианины Нафталинсульфо- наты	Флуоресценция »	Поверхностный за- ряд мембран	[56—59] [43, 60]
Дифенилгекса- триен	Флуоресценция	Микровязкость	[61, 62]
Антроиловые эфирь	Поляризация	Текучесть мембран	[63—65]

¹⁾ Приведенные ссылки не обязательно указывают первые работы, где описано использование данного хромофора; они служат скорее источником ссылок, позволяющим более детально ознакомиться с оригинальной литературой.

²⁾ Более подробно об этих хромофорах говорится в тексте.

тиноиды — вторичные антенные пигменты, поскольку положение их максимумов поглощения зависит от трансмембранного электрического потенциала [2]. Это свойство оказалось весьма полезным для изучения механизмов преобразования энергии при фотосинтезе и стимулировало интенсивные поиски экзогенных пигментов с аналогичными свойствами, которые можно было бы использовать для исследования генерации трансмембранного электрического потенциала другими мембранными системами [3].

Кроме регистрации мембранного потенциала, экзогенные пигменты применяют для наблюдения за целым рядом характеристик клетки, например за pH цитоплазмы и содержимого

различных органелл, концентрацией Ca^{2+} и Mg^{2+} в цитоплазме, текучестью мембранных липидов или микровязкостью, судьбой захваченных из окружающей среды частиц. В этих случаях краситель выбирают так, чтобы он был: 1) чувствителен к изменениям регистрируемого параметра; 2) способен достигать конечного пункта назначения. У индикаторов на плазматический pH или Ca^{2+} наблюдается характерное изменение флуоресценции или поглощения в зависимости от концентрации катионов в среде. Способные проникать через мембрану эфиры этих индикаторов диффундируют внутрь компартмента, где эндогенные ферменты катализируют их гидролиз с образованием *in situ* активной формы индикатора. Диапазон возможных экспериментов с использованием индикаторов столь велик, что детально описать каждый из них практически невозможно. Однако не всегда понимают, насколько просто можно поставить многие эксперименты, используя лишь доступное для большинства лабораторий оборудование. Многие методические подходы и процедуры, которых мы коснемся в этой главе, детально описаны в практическом руководстве [4] по применению спектрофотометрии и флуориметрии в биохимических исследованиях.

2. Постановка эксперимента

2.1. Оборудование

Для проведения спектроскопических измерений нужен либо спектрофотометр, измеряющий поглощение света, либо флуориметр, измеряющий флуоресценцию, либо микроскоп, с помощью которого в принципе можно измерять флуоресценцию или поглощение единичной клетки или небольшой группы клеток. При спектро- и флуориметрических измерениях используют обычно суспензии мембран, налитые в стандартные кюветы; микроскопические измерения дают двумерное изображение мазков, срезов или поверхностей. Флуориметры и спектрофотометры, снабженные волоконно-оптическими световодами, позволяют исследовать и поверхности. Для этого с помощью одного световода (пучка оптических волокон) освещают нужный участок поверхности, а с помощью другого передают отраженный свет или свет, испускаемый при флуоресценции, на детектор, обычно фотоумножитель (рис. 7.1). Отраженный свет имеет две компоненты: зеркально отраженный и диффузно отраженный свет. Информацию (аналогичную поглощению) о присутствующих на поверхности хромофорах дает только последняя компонента. При всех типах фотометрии для отделения интересующего исследователя сигнала от рассеянного света применяют фильтры и/или монохроматоры.

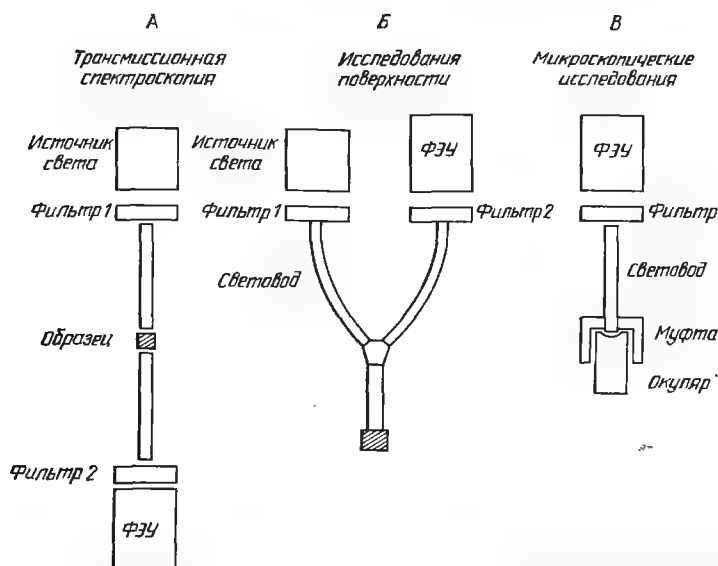


Рис. 7.1. Использование волоконной оптики для спектроскопических исследований биологических объектов. На схеме изображены три способа регистрации поглощения или флуоресценции. *А.* Свет подводится к образцу с помощью гибкого световода, длина которого может достигать 2 м. Свет, прошедший через образец, собирается вторым световодом и передается на фотоумножитель (ФЭУ). Свет с нужным диапазоном длин волн «вырезается» с помощью фильтров, пропускание которых лучше, чем монохроматоров. Когда записываются спектры, фильтры заменяют монохроматорами. Для измерения поглощения нужен только один световод, который помещают в положение 1 или 2; при измерении флуоресценции фильтр 1 должен пропускать только возбуждающий свет, а фильтр 2 — только испускаемый. Очень важно убедиться в том (несмотря на все заверения и гарантии фирмы-изготовителя), что в отсутствие флуорофора никакой сигнал не регистрируется! Если интенсивность флуоресценции мала, возбуждающий свет, прошедший через фильтр 2, может полностью маскировать флуоресценцию. Чтобы предотвратить попадание на фотоумножитель постороннего света, все измерения необходимо проводить в темной комнате. *Б.* В этом случае измеряются оптические параметры поверхности образца. Все замечания, высказанные по поводу схемы *А*, справедливы и при такой постановке эксперимента. При этой схеме можно регистрировать флуоресценцию и/или отражение. Раздвоенные световоды имеются в продаже; их делают либо из случайным образом смешанных и соединенных в общий конец волокон двух световодов (наиболее удобный вариант), либо соединяют с одного конца два световода. Более сложные конструкции описаны в работах [25, 37, 66]. *В.* В таком варианте световод располагают вплотную к окуляру микроскопа. Чтобы посторонний свет не попал на ФЭУ, световод с помощью лагуной муфты плотно прижимают к окуляру.

Таблица 7.2. Последовательность операций для определения экспозиции с помощью присоединенной к флуоресцентному микроскопу автоматической фотокамеры

1. Выбирают и устанавливают на шкале фотокамеры подходящую чувствительность пленки (ASA/DIN). Чем больше выставленная чувствительность пленки, тем больше чувствительность автоматического экспонометра; экспозиции 20 с при ASA 100 соответствует 10 с при ASA 200.
2. Выбирают подходящее поле зрения, используя трансмиссионную или фазово-контрастную аппаратуру.
3. Переключают микроскоп на флуоресцентную оптику.
4. С помощью камеры определяют время экспозиции. Для этого включают секундомер одновременно с открытием шторки и выключают, как только слышат щелчок, сопровождающий закрытие шторки. Если полученное время экспозиции меньше 10 с, устанавливают меньшее значение чувствительности пленки, а если больше 100 с, то более высокое значение ASA.
5. Повторяют этапы 1—4 не менее пяти раз, каждый раз случайным образом выбирая поле зрения.
6. Среднее время экспозиции (скорректированное с учетом установленной ASA) обратно пропорционально интенсивности флуоресценции изображения.

Используя световоды, можно «переоборудовать» микроскоп в фотометр или флуориметр; для этого свет из окуляра собирают с помощью световода и передают на соответствующий детектор. Световод закрепляют с помощью плотно пригнутой латунной муфты, чтобы исключить попадание комнатного света. Другой способ измерения интенсивности светового потока от изображения основан на использовании фотометрирующей системы, присоединенной к микроскопу фотокамеры. Правильно выбранное время экспозиции пленки заданной чувствительности (ASA/DIN) обратно пропорционально яркости изображения; для клеток, интенсивность флуоресценции которых вдвое выше, чем у контрольных, требуется и вдвое меньшая экспозиция. В некоторых случаях (например, при работе на микроскопе Leitz Orthomat) фотометрирующая система может работать и без пленки. Время экспозиции, представляющее собой интервал между моментами открывания и закрывания шторки, определяют по секундомеру. Для аккуратных измерений это время должно лежать в диапазоне 10—100 с; более короткие времена трудно измерить, а при более длительных экспозициях значительный вклад вносят попадающий в объектив паразитный свет (обсуждение его роли см. в разд. 2.4.1) и засветка. Общая процедура определения экспозиции описана в табл. 7.2. Зависимость обратного времени экспозиции от интенсивности носит линейный характер в очень широком диапазоне параметров [4], т. е. время экспозиции обратно пропорционально интенсивности испускаемого света. При большом увеличении обычно наблюдается фотовыцветание, проявляющееся в зависящем от времени

уменьшении интенсивности. В этом случае нужно уменьшить экспозицию и свести к минимуму время освещения данного поля объекта.

2.2. Выбор хромофора

Прежде всего нужно выбрать хромофор, приемлемый для решения поставленной задачи. Если имеются в виду внутренние, эндогенные хромофоры, это означает выбор такого объекта, в котором данный хромофор присутствует и ведет себя соответствующим образом. Например, каротиноидные пигменты реагируют на мембранный потенциал, генерируемый на свету в ходе реакций фотосинтеза. Такие пигменты содержатся во многих фотосинтетических мембранах, но их использование в роли «молекулярных вольтметров» легче всего продемонстрировать на препаратах, известных под названием «хроматофоры», из некоторых фотосинтетических бактерий, например *Rhodobacter sphaeroides* и *Rhodobacter capsulata*. Для изучения потребления и транспорта кислорода *in vivo* необходимы богатые кровеносными сосудами ткани, содержащие большое количество митохондрий, например мозг, печень или сердечная мышца (правда, в последнем случае практически невозможно отделить вклад миоглобина от вклада гемоглобина). Во всех этих случаях, однако, переносчики кислорода, как правило, оптически маскируют митохондриальные пигменты, концентрация которых в тканях значительно меньше.

Выбор экзогенных хромофоров определяется в основном тремя факторами.

2.2.1. Доставка хромофора и месту назначения

Большинство оптических зондов, используемых для изучения мембран, представляют собой липофильные соединения и могут храниться в виде концентрированного раствора в таких растворителях, как этанол или диметилсульфоксид. Этот раствор разбавляют по крайней мере в 200 раз мембранным препаратом, и краситель диффундирует к месту назначения. Подобное мечение неспецифично, и в случае мультимембранных систем, например интактных клеток, зонды неравномерно распределяются между различными компартментами. Это хорошо, если краситель концентрируется в интересующей исследователя области (например, цианиновые красители концентрируются в митохондриях [5], а слабые основания — в эндосомах с кислым содержимым [6, 7]). Однако, если нужно измерить pH цитоплазмы (разд. 3.3.2) или потенциал на плазматической мембране (разд. 3.2.2), то прежде чем использовать такие

красители, необходимо провести соответствующие измерения, которые позволили бы учесть присутствие красителей в других компартментах клетки.

Специфичность мечения удастся немного повысить, используя неактивные производные красителей (обычно их эфиры), которые локально переходят в активную форму с помощью эндогенных эстераз. Такой методический подход применяли для оценки содержания в цитоплазме Ca^{2+} и H^{+} с помощью флуоресцирующих аналогов ЭДТА [8, 9]. Специфичность достигается тем, что активные эстеразы локализируются исключительно в изучаемом компартменте (разд. 3.3.2).

Специфическое мечение можно осуществить, ковалентно пришив хромофор к какой-либо молекуле-носителю, обычно иммуноглобулину или гормону, который избирательно связывается с клеточным рецептором.

2.2.2. Конкуренция с эндогенными пигментами

Мембраны содержат компоненты, которые поглощают свет в ближней УФ-области и сильно рассеивают голубой свет. Поэтому обычно удобнее использовать зонды с максимумом флуоресценции или поглощения в красной области спектра. Напомним, однако, что многие фотометры менее чувствительны к красному свету, чем к синему, поэтому преимущества, получаемые при работе с красителем, оптические характеристики которого не столь близки к характеристикам природных пигментов, в значительной мере нивелируются уменьшением чувствительности аппаратуры. Флуоресценция экзогенных зондов сильно тушится, если их спектр испускания перекрывается с интенсивной полосой поглощения эндогенных хромофоров. Клетки флуоресцируют в желто-зеленой области спектра (вероятно, благодаря наличию флавинов), что затрудняет использование хромофоров на основе флуоресцеина. Кроме того, наблюдается слабая флуоресценция клеток в красно-оранжевой области, спектр которой перекрывается со спектром флуоресценции производных родаминового ряда. При благоприятных условиях изменения флуоресценции обнаруживаются даже в тех случаях, когда изменение поглощения маскируется поглощением эндогенных пигментов [10].

2.2.3. Токсическое действие хромофоров

Нетоксичные при низких концентрациях хромофоры, накапливаясь в определенных компартментах, могут становиться мощными ингибиторами. Так, цианиновые красители сильно подавляют дыхание в пункте I сопряжения дыхательной цепи

митохондрий при условии, что потенциал на внутренней митохондриальной мембране достаточно велик (отрицателен внутри) [11]. В живых клетках потенциал внутренней мембраны митохондрий составляет около 180 мВ, а потенциал плазматической мембраны — около 60 мВ (оба отрицательны внутри), и при концентрации цианина в среде 10^{-7} М электрохимическое равновесие устанавливается, когда его концентрация в матриксе митохондрий достигает величины 10^{-3} М. Таким образом, даже очень низкие концентрации цианиновых красителей могут отрицательно сказаться на клеточном дыхании и энергозависимых процессах [11].

2.3. Характеристика и калибровка оптических сигналов

После выбора хромофора и системы необходимо охарактеризовать их оптические свойства. Во-первых, в спектре хромофора (поглощения или флуоресценции) *in situ* могут появиться дополнительные полосы, которые будут ограничивать возможности эксперимента. Во-вторых, такие предварительные исследования позволяют установить отношение сигнала к шуму для тех характеристик, которые предполагается измерять (шум понимается в самом общем смысле).

К сожалению, при калибровке оптических сигналов (будь то измерение рН, трансмембранного потенциала или концентрации катиона) обычно приходится разрушать экспериментальную систему. Например, ионофоры необратимо изменяют мембранный потенциал в процессе калибровки сигнала индикаторных красителей. Аналогично, провести калибровку сигнала индикаторов внутриклеточного рН или Ca^{2+} можно только после того, как мембрана сделана полностью проницаемой. Лишь после проведения соответствующей калибровки можно приступить к прямому изучению системы.

2.4. Артефакты

Оптические исследования биологических мембран таят в себе много неожиданного, и прежде чем приступать к интерпретации экспериментальных данных, необходимо провести самые строгие и тщательные контрольные опыты. Артефакты чаще всего встречаются при флуоресцентных измерениях. Рассмотрим те из них, которые наиболее легко устранимы.

2.4.1. Паразитный свет и мутные растворы

Понятие «паразитный свет» относится к любому попавшему на детектор свету, который либо не связан с флуоресценцией, либо — если речь идет об измерении поглощения — имеет

длину волны, отличную от заданной. Это может быть свет, попавший в прибор снаружи, или побочный свет, прошедший от источника через монохроматоры и фильтры. Долю паразитного света можно уменьшить, если правильно сконструировать прибор, выбрать нужные фильтры (чтобы исключить дифракцию более высокого порядка и зеркальное отражение от решетки монохроматора) и работать в темной комнате.

Суспензии биологических мембран мутные. В этом случае особенно важно отдифференцировать вклад рассеянного света. Поскольку рассеянный свет по своей интенсивности значительно превосходит флуоресценцию, необходимо тщательно подбирать фильтры и ширину щелей, чтобы измерять только флуоресценцию [12]. Важно помнить, что если в суспензии мембранных везикул происходит резкое изменение осмолярности или в среду вводятся проникающие через мембрану соли, то может произойти значительное изменение мутности суспензии, а следовательно, и интенсивности флуоресценции или поглощения [13]. Чтобы «уловить» как можно больше высвеченных или прошедших через образец квантов света, кювету обычно помещают максимально близко к детектору.

Мутные растворы оказываются предпочтительными, если хромофор имеет низкий коэффициент экстинкции или может использоваться только при очень низких концентрациях. Это связано с тем, что в результате многократного отражения света от частиц суспензии значительно увеличивается эффективная длина оптического пути при измерении поглощения, а следовательно, и доля поглощенного света (следствие закона Ламберта — Бэра). В этом случае большие преимущества дает использование *двухволнового* режима регистрации, когда измеряется поглощение при одной длине волны относительно поглощения при второй, слегка отличающейся длине волны, *в одной кювете*. Изменения мутности суспензии в равной мере влияют на поглощение при обеих длинах волн и, следовательно, нивелируются [4, 14].

2.4.2. Неадекватное возбуждение

Возбуждающий свет может поглощаться нефлуоресцирующими компонентами системы; такая проблема возникает, например, при регистрации поверхностной флуоресценции тканей и органов. Так, кровь полностью поглощает свет, используемый для возбуждения флуоресценции пиридиннуклеотидов и флавопротеинов. При увеличении количества крови в поле зрения (например, вследствие расширения сосудов) уменьшается интенсивность флуоресценции, и можно прийти к ошибочному выводу об изменении окислительно-восстановительного состоя-

ния митохондрий. Для решения этой проблемы нужно измерять отношение интенсивностей флуоресценции пиридиннуклеотидов (PN) и флавопротеинов (FP): при восстановлении митохондрий интенсивность флуоресценции PN увеличивается, а FP уменьшается, при окислении же наблюдается обратная картина. Следовательно, указанное отношение может служить весьма чувствительным индикатором окислительно-восстановительного состояния митохондрий [15]. Оно не подвержено тем нежелательным эффектам, о которых мы говорили выше, поскольку оба компонента изменяются в одинаковой степени, а их отношение сохраняется. Альтернативный подход к учету поглощения пигментов крови состоит в коррекции флуоресценции, т. е. определении разности между измеряемой интенсивностью флуоресценции и интенсивностью отражения (возбуждающего света). В этом случае уменьшение возбуждения из-за поглощения света пигментами крови приводит к уменьшению интенсивности отраженного света, которое компенсирует уменьшение флуоресценции. Адекватность данной процедуры была продемонстрирована на перфузированных системах, в которых кровь заменили прозрачным раствором [16], но насколько она применима к экспериментам *in vivo* — не совсем ясно.

Возбуждающий свет может поглощаться флуорофором настолько сильно, что по мере его прохождения через образец интенсивность флуоресценции будет падать. Это одно из проявлений так называемого эффекта внутреннего фильтра [4, 12]. На существование подобного эффекта может указывать начальное увеличение флуоресценции при разбавлении образца. Он проявляется, например, в том случае, если детектор регистрирует свет, испускаемый лишь определенной частью образца, до которой возбуждающий луч доходит только в разбавленных растворах. Рис. 7.2 иллюстрирует этот эффект на примере простого эксперимента, который можно провести с любым флуориметром. Ожидаемая линейная зависимость между интенсивностью флуоресценции и концентрацией наблюдается только в разбавленных ($< 10^{-3}$ M) препаратах [4]. Следует помнить, что возбуждающий свет может поглощаться не только данным флуорофором, и чтобы избежать эффектов внутреннего фильтра, необходимо поддерживать низким именно *общее* поглощение образца.

Эффекты внутреннего фильтра можно уменьшить, изменив геометрию эксперимента: флуоресценция с поверхности сильно поглощающего образца значительно менее чувствительна к этим эффектам, поскольку ни возбуждающий, ни испускаемый свет в этом случае не должен проходить всю толщу непрозрачного образца. Так, если для возбуждения использовать микроскоп с флуоресцентной приставкой, то эффективная длина оптиче-

ского пути составит величину порядка нескольких микрон и эффект фильтра будет мал. Поэтому сравнение результатов, полученных с помощью микроскопа, с результатами, полученными на стандартном флуориметре, не всегда бывает правомочным. Цианиновые красители очень эффективно поглощаются митохондриями *in vivo* [5], что приводит к тушению флуоресценции, регистрируемой в суспензии клеток [17]; однако во флуоресцентном микроскопе митохондрии выглядят как ярко флуоресцирующие нитевидные структуры [5]. Аналогично накопление кислыми эндосомами акридинового оранжевого и 9-аминоакридина приводит к тушению их голубой флуоресценции; во флуоресцентный же микроскоп они видны как желтые или оранжевые везикулы — цвет, характерный для спектра испускания очень концентрированных растворов данных красителей [4].

2.4.3. Образование комплексов

Выбранный для исследований краситель может взаимодействовать с компонентами системы, что естественно вызовет изменение их свойств. Так, значение pK_a pH-индикаторов в рас-

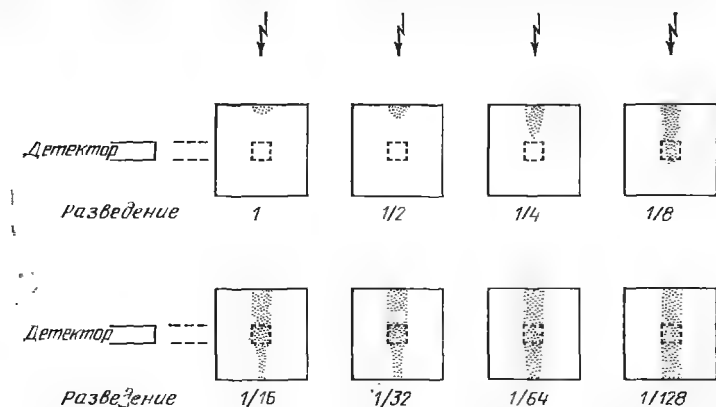


Рис. 7.2. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации флуорофора. В кварцевую кювету (при измерении флуоресценции необходимо использовать кюветы, все стенки которых прозрачны) был залит 1 мМ раствор 9-аминоакридина в дистиллированной воде. Флуоресценцию измеряли на флуоресцентном спектрофотометре Perkin-Elmer MPF 44A. Длина волны возбуждающего света 410 нм, ширина щели 6 нм. Кювету помещали в кюветное отделение и открывали шторку для прохождения возбуждающего света при закрытой шторке для испускаемого света; лучше проводить измерения в темной комнате. Та область, в которой наблюдалась голубая флуоресценция 9-аминоакридина, отмечена точками. Детектор регистрировал только свет, испускаемый небольшим объемом раствора в центре кюветы (квадрат). При уменьшении концентрации 9-аминоакридина путем последовательного разведения раствора область, где наблюдалась голубое свечение, постепенно увеличивалась. Направление возбуждающего света указано стрелкой.

творе вовсе не обязательно равно pK_a для индикатора, связанного с клеточными или иными компонентами (см., например, работы [18, 19]); спектры связанного и свободного красителя могут различаться, что затрудняет оценку величины pH. Краситель может быть удобен как качественный индикатор исследуемого параметра, но калибровка его характеристик затрудняется тем, что он образует комплексы с агентами, необходимыми для процедуры калибровки. Всегда полезно использовать несколько независимых способов калибровки, чтобы убедиться во внутренней непротиворечивости результатов. Так, при калибровке оптических зондов мембранного потенциала [20, 21] должны получаться одни и те же значения при использовании валиномицина/ K^+ или разобщителя карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразона/ H^+ .

2.5. Низкотемпературная спектроскопия

С уменьшением температуры образца изменяются и его поглощение, и его флуоресценция, причем часто таким образом, что при этом спектроскопические исследования упрощаются. При температуре жидкого азота (77 К) максимумы поглощения большинства гемопroteинов сдвигаются в голубую область спектра (на 1—4 нм) относительно их положения при комнатной температуре, и при этом значительно изменяются параметры полос [4, 22]: они становятся уже и интенсивнее. Последний эффект связан как с внутренними изменениями в экстинкции, так и с увеличением эффективной длины оптического пути (той же причине, что и для мутных растворов; см. разд. 2.4.1).

Улучшение спектральных характеристик и отсутствие химических изменений в образце при очень низких температурах позволяет регистрировать спектры индивидуальных компонентов сложных систем, например интактных электронтранспортных цепей. Удивительно, что некоторые окислительно-восстановительные реакции и обмен лигандами идут даже при 4 К, что позволяет изучать реакции, протекающие при обычных условиях очень быстро. Смесь исследуемых реагентов замораживают, и фотохимическим путем индуцируют нужную реакцию [4, 23, 24].

Процессы тушения значительно более чувствительны к температуре, чем сама флуоресценция, поэтому выход флуоресценции почти всегда возрастает с уменьшением температуры. При 77 К интенсивность флуоресценции флавопротеинов митохондрий увеличивается по крайней мере на порядок, что позволяет изучать окислительно-восстановительное состояние митохондрий в замороженных тканях флуориметрическими методами [15].

Фирменные спектрофотометры часто бывают снабжены низкотемпературными приставками, обычно дорогими. Описаны также более простые самодельные устройства [4, 23]. Мы же в своей лаборатории для регистрации сигналов при 77 К просто погружаем конец световода в жидкий азот, где находится образец [25]. Таким образом были получены спектры отражения замороженных почек крыс; их анализ позволил выявить дезоксигенацию гемоглобина и восстановление цитохрома aa_3 при ишемии. Отметим также, что при исследовании этих препаратов в одном и том же поле зрения обнаруживаются и восстановленный цитохром aa_3 , и оксигемоглобин. Это указывает на значительную гетерогенность данного органа с точки зрения метаболизма (рис. 7.3).

Некоторые реакции с участием гемопротеинов можно выявить только при кинетических измерениях, проводимых при 4 К (температуре жидкого гелия); к сожалению, соответствующая аппаратура имеется лишь в немногих лабораториях.

3. Примеры

3.1. Окислительно-восстановительное состояние митохондрий *in situ*

Свойства суспензий интактных митохондрий всесторонне и тщательно исследовались. С помощью двухволновой спектроскопии ([14]; разд. 2.4.1) удалось охарактеризовать индивидуальные пигменты дыхательной цепи. Однако всегда остается вопрос: насколько наблюдаемые свойства изолированных препаратов соответствуют свойствам системы *in vivo*? Чтобы ответить на него, можно попытаться исследовать свойства пигментов дыхательной цепи *in situ*. Спектроскопические исследования изолированных тканей анестезированных животных [25, 26] позволяют судить об окислительно-восстановительном состоянии электронтранспортной цепи и о степени насыщения кислородом гемоглобина/миоглобина. К сожалению, быстрые флуктуации в скоростях доставки и потребления O_2 затрудняют установление истинных стационарных состояний. Поэтому для проведения измерений лучше быстро заморозить ткани и проводить измерения при низких температурах — в условиях лучшего разрешения (разд. 2.5).

На рис. 7.3 приведены спектры отражения замороженных почек крыс, полученные следующим образом.

1. Удаляли почки у анестезированного животного и быстро их замораживали, зажав в охлажденных до 77 К щипцах из алюминия [27].

2. Замороженные ткани хранили при 77 К и регистрировали спектры с поверхности с помощью раздвоенного световода (рис. 7.1), конец которого охлажден до 77 К и подходит вплотную к замороженной ткани.

Были зарегистрированы спектры трех разных препаратов почек: естественно перфузированной и почек, у которых была вызвана ишемия путем наложения лигатуры на почечную артерию, а затем — через 1 мин и 10 мин — они были заморожены в жидком азоте. Спектр отражения ткани в видимой области обусловлен в основном поглощением оксигемоглобина ($\lambda_{\max}=542$ и 577 нм), гемоглобина ($\lambda_{\max}=555$ нм), ферроцитохромов aa_3 ($\lambda_{\max}=605$ нм) и c ($\lambda_{\max}=550$ нм). Избыток гемоглобина в ткани приводит к тому, что в суммарном спектре полосы поглощения ферроцитохромов имеют вид плеча, а не четкого максимума. В спектре нормальной почки (кривая 1) присутствуют только полосы поглощения оксигемоглобина, что говорит о полноценном снабжении ткани кислородом и полноценном митохондриальном дыхании. Через 1 мин после наложения лигатуры (кривая 2) содержание оксигемоглобина сильно падает и в спектре появляются плечи при 605 и 550 нм, что указывает на восстановление митохондриальной дыхательной цепи сразу после прекращения поступления кислорода. Спектр, снятый через 10 мин после наложения лигатуры, идентичен спектру, снятому через 1 мин; разность этих спектров (кривая 3) практически совпадает с базовой линией. Интересно, что

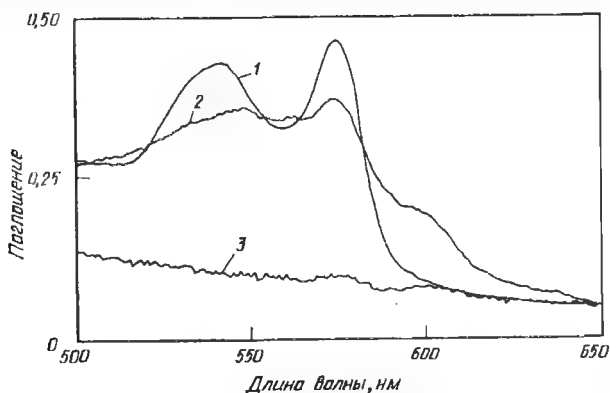


Рис. 7.3. Спектры отражения замороженных почек крысы (способ получения препаратов описан в тексте). Измерения проводили по схеме, представленной на рис. 7.1,Б (см. также работу [25]); опорная длина волны — 700 нм. Спектр отражения белого полистирола запоминался и использовался как базовый. 1 — естественно перфузированная почка; 2 — спектр почки через 1 мин после наложения лигатуры; 3 — разность между спектрами почек, замороженных через 1 и 10 мин после наложения лигатуры. (Из работы [29], с разрешения авторов.)

оксигемоглобин не полностью исчезает из ишемической ткани, т. е., по-видимому, существуют некие метаболические компартменты, в которые кислород доставляется, но не потребляется [28, 29].

Аналогичные эксперименты с замороженной корой головного мозга песчанки ([25, 30]; рис. 7.4) показывают, что восстановление митохондриальных пигментов происходит только при полной аноксии. На рис. 7.4 приведен разностный спектр отражения, полученный вычитанием спектра препарата, изолированного из животного, которое дышало в течение 1 мин газовой смесью, содержащей 5% кислорода, из спектра отражения коры головного мозга животного, дышавшего 1 мин смесью без кислорода. В обоих случаях гемоглобин был в значительной степени дезоксигенирован, и разностный спектр целой ткани очень похож на разностный спектр окисленных и восстановленных митохондрий. Это означает, что даже в условиях, когда гемоглобин ткани почти полностью дезоксигенирован, для функционирования дыхательной цепи все еще достаточно кислорода. Другими словами, *in vivo*, как и *in vitro*, наблюдается огромная разница в средстве митохондрий и гемоглобина к кислороду.

Эксперименты, результаты которых представлены на рис. 7.3 и 7.4, выполнены на двухволновом сканирующем спектрофотометре, снабженном микропроцессором, который позволяет регистрировать, хранить и обрабатывать спектры. Подоб-

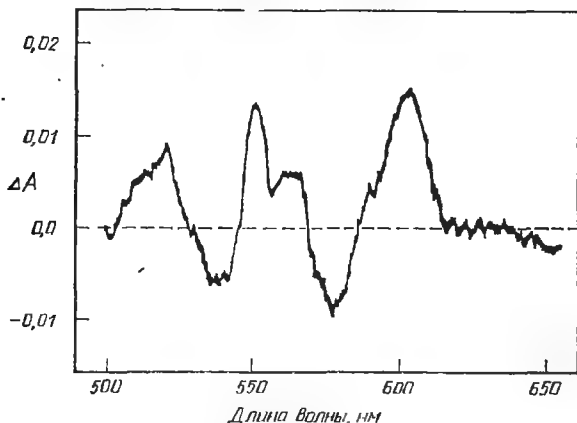


Рис. 7.4. Разностный спектр отражения замороженной коры головного мозга песчанки [30]. Мозг замораживали через 1 мин после того, как анестезированное животное начинало дышать газовой смесью, содержащей 5% O_2 , 90% N_2 , 5% CO_2 или 95% N_2 , 5% CO_2 . С помощью сканирующего спектрофотометра, снабженного раздвоенным световодом (рис. 7.1,Б), регистрировали спектры отражения коры правого полушария при 77 К и получали разностный спектр отражения.

ные приборы для измерения отражения выпускают фирмы Perkin Elmer (Lambda 5UV/Vis, спектрофотометр с наружной интегрирующей сферой) и Applied Photophysics Ltd., London.

3.2. Мембранный потенциал органелл и клеток

Большинство биологических мембран способны поддерживать разность электростатического потенциала между водными фазами, которые они разделяют. Этот потенциал, обычно называемый трансмембранным потенциалом, часто играет очень большую роль в функционировании мембраны. Он, например, весьма критичен для передачи сигнала возбудимыми клетками; участвует в аккумуляции питательных веществ, переносимых через плазматическую мембрану многих клеток за счет энергии электрохимического градиента ионов Na^+ . В субклеточных органеллах — хлоропластах и митохондриях — мембранный потенциал является важнейшим «высокоэнергетическим» интермедиатом синтеза АТФ. Прямая регистрация потенциала с помощью микроэлектродов часто практически невыполнима, поэтому трансмембранный потенциал измеряют косвенными методами; наиболее популярные из них основаны на использовании чувствительных к потенциалу специфических красителей [31].

У очень многих красителей наблюдается изменение спектра поглощения или флуоресценции в ответ на изменения трансмембранного потенциала [3], но откалибровать эти изменения по известным потенциалам часто бывает довольно трудно. Проще всего это сделать, увеличивая проницаемость мембраны для определенных катионов, обычно K^+ или H^+ , путем добавления к системе реагентов, называемых ионофорами. В присутствии соответствующего ионофора при условии, что проницаемость для всех прочих ионов относительно мала, мембранный потенциал V примерно определяется уравнением Нернста

$$V = (-RT/F) \ln ([M^+]_в/[M^+]_н), \quad (1)$$

где $[M^+]$ — концентрация соответствующего иона, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, F — постоянная Фарадея. При 37°C это соотношение сводится к виду

$$V (\text{мВ}) = -61,5 \lg ([M^+]_в/[M^+]_н), \quad (2)$$

из которого следует, что при десятикратном увеличении или уменьшении градиента концентрации катиона потенциал изменится на 61,5 мВ. Градиент можно изменить, меняя концентрацию M^+ в среде, а следовательно, в присутствии ионофора можно получить калибровочную кривую — зависимость оптического параметра от потенциала.

3.2.1. Индуцированный светом мембранный потенциал в хроматофорах

Хроматофоры, выделенные из фотосинтезирующих бактерий, представляют собой идеальную модельную систему для изучения изменений мембранного потенциала. Транспорт электронов в фотосинтетическом реакционном центре «запускается» инфракрасным светом, и с помощью короткой интенсивной вспышки света можно инициировать однократное срабатывание фотосинтетического аппарата, при котором по электронтранспортной цепи происходит перенос одного электрона. В результате электронного транспорта H^+ -ионы накачиваются внутрь хроматофора и создается значительный мембранный потенциал (до 300 мВ, «плюс» внутри). Последний в свою очередь вызывает электрогенный сдвиг полос поглощения каротиноидных пигментов. Этот потенциалзависимый сдвиг можно откалибровать с помощью K^+ в присутствии ионофора валиномицина ([2]; см. разд. 3.2.2).

На рис. 7.5 приведен разностный спектр «свет минус темнота» суспензии хроматофоров *R. sphaeroides*, содержащей индикатор мембранного потенциала — оксонол-VI. Минимум при 590 нм и максимум при 630 нм связаны с «красным» сдвигом полос поглощения оксонола (в отсутствие красителя при данной чувствительности спектр хроматофоров не имеет в этой области характерных особенностей), а максимум и минимум между 400 и 520 нм — с «красным» сдвигом полос поглощения каротиноидов. Таким образом, как внутренние, так и наружные хромофоры реагируют на трансмембранный потенциал, причем по первым можно судить о свойствах вторых. Детальное изучение этой системы [32] позволило установить механизм ответа оксонола на потенциал: вначале краситель мигрирует внутрь хроматофора [распределение красителя в толще мембраны подчиняется уравнению (1)], а затем связывается с гидрофобными сайтами. Именно по такой схеме работают многие из наиболее широко используемых оптических индикаторов мембранного потенциала. Изменение поглощения оксонола в этой системе пропорционально логарифму трансмембранного потенциала.

3.2.2. Потенциал плазматической мембраны животных клеток

Мембранный потенциал целых клеток в отличие от изолированных органелл оценить с помощью оптических индикаторов значительно сложнее, поскольку клетки содержат множество субклеточных компартментов и необходимо дифференцировать изменения оптических свойств, связанные с состоянием плазматической мембраны и любой другой мембранной структуры. Например, интенсивное окрашивание митохондрий цианиновыми

красителями [5] — проникающими через мембрану катионами — означает, что, если для измерения потенциала плазматической мембраны выбраны цианиновые красители или иные липофильные катионы, нужно позаботиться, чтобы митохондриальная мембрана была незаряжена. Если использовать краситель анионной природы, эта проблема не возникает, но зато появляется новая: анионы, даже довольно липофильные, плохо проникают внутрь клетки. Поэтому для изучения целых клеток, как и хроматофоров, мы используем оксонол, но не пропиловое, а фенильное производное. На рис. 7.6 проиллюстрирована процедура измерения потенциала плазматической мембраны с помощью индикатора оксонола-V [33].

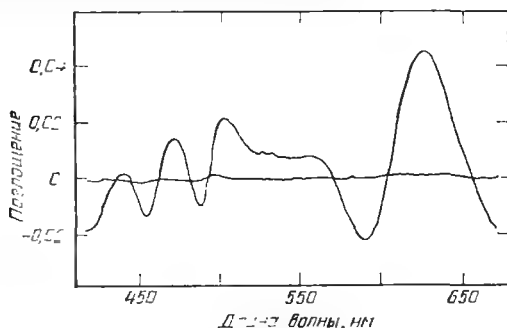


Рис. 7.5. Разностный спектр «свет минус темнота» хроматофоров из *R. sphaeroides* в присутствии оксонола-VI. Хроматофоры выделяли из клеток *R. sphaeroides* GA [68] и суспендировали (конечная концентрация бактериохлорофилла $2,1 \cdot 10^{-5}$ М) в среде, содержащей 100 мМ KCl, 20 мМ морфолинопропансульфонат (MOPS), 1 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ аскорбат, $1,5 \cdot 10^{-6}$ М оксонол-VI; pH довели с помощью KOH до 6,9 при 23 °C [32]. Спектр поглощения суспензии регистрировали, используя в качестве опорной длину волны 670 нм, и хранили в памяти ЭВМ двухлучевого спектрофотометра фирмы Johnson Foundation Scanning [25, 69]; интенсивность света, используемого при измерениях, была недостаточна для возбуждения фотосинтеза. Второй спектр регистрировали, освещая образец в направлении, перпендикулярном направлению регистрации, лампой накаливания мощностью 15 Вт. Возбуждающий свет нужной длины волны (>750 нм) получали, пропуская свет через красный светофильтр (№ 88 А, Kodak Wratten Gelatin). Инфракрасный свет активировал фотосинтез и не мешал регистрации спектра в области между 400 и 670 нм благодаря низкой чувствительности фотоумножителя к ИК-свету. Третий спектр записывали и запоминали с помощью компьютера после выключения инфракрасного освещения. Представлены два разностных спектра: спектр 1 минус спектр 3 — базовая линия без каких-либо максимумов или минимумов, что свидетельствует об отсутствии индукции фотосинтеза измеряющим светом; спектр 2 минус спектр 1 — разностный спектр «свет минус темнота». Максимум и минимум между 550 и 670 нм обусловлены энергозависимым сдвигом спектра поглощения оксонола-VI в красную область; максимумы и минимумы между 400 и 520 нм отражают зависимость от трансмембранного потенциала сдвиг полос поглощения каротиноидных пигментов [32]. (Из работы [32] с разрешения авторов.)

1. Клетки суспендируют в физиологическом растворе при 37°C в присутствии красителя (сыворотки или иные альбумин-содержащие среды использовать не следует, поскольку альбумин свяжет весь оксонол, и краситель не сможет взаимодействовать с клетками). После установления равновесия (через ≈ 10 мин) поглощение суспензии стабилизируется.

2. В этот момент добавляют валиномицин, под действием которого трансмембранный потенциал смещается в сторону равновесного значения K^+ -потенциала [определяемого уравнением (1)]. Поглощение оксонола при этом соответствующим образом изменяется. В целых клетках запас K^+ весьма велик, и потенциал в присутствии оксонола и валиномицина, по-видимому, довольно стабилен. Когда равновесный K^+ -потенциал становится равен мембранному, добавление валиномицина не сказывает-

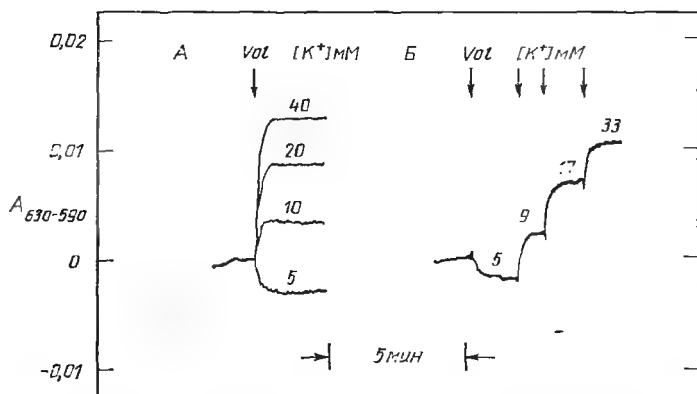


Рис. 7.6. Измерение мембранного потенциала клеток Леттре с помощью оксонола-V. А. $5 \cdot 10^6$ клеток/мл суспендировали в 5 мМ HEPES, 1 мМ MgCl_2 , в присутствии $2,2 \cdot 10^{-6}$ М оксонола-V; pH доводили до 7,4 раствором NaOH при 33°C . Среда содержала также KCl (конечная концентрация указана над кривыми) и NaCl (столько, чтобы суммарная концентрация KCl и NaCl составила 155 мМ). Добавляли валиномицин до концентраций $1 \cdot 10^{-8}$ г/мл (указано стрелками). Записи кинетики четырех отдельных экспериментов совмещены так, чтобы сигналы перед добавлением валиномицина совпадали. Концентрация K^+ в среде, при которой валиномицин не вызывает изменений поглощения, была получена путем интерполяции и составила 7,1 мМ; внутриклеточная концентрация K^+ равна 73,3 мМ. Отсюда, используя уравнение (2), можно вычислить трансмембранный потенциал, равный в данных условиях -62 мВ. Б. $5 \cdot 10^{-6}$ клеток Леттре в 1 мл суспендировали в среде, содержащей 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 5 мМ HEPES, 1 мМ MgCl_2 , $2,2 \cdot 10^{-6}$ М оксонол-V; pH доводили раствором NaOH до 7,4 при 33°C . Время добавления валиномицина ($1 \cdot 10^{-8}$ г/мл) и KCl (концентрации указаны над кривыми) отмечено стрелками. Концентрация K^+ в среде, при которой валиномицин не приводит к изменениям поглощения, равна 6,9 мМ, концентрация K^+ в цитоплазме — 63,3 мМ, а потенциал плазматической мембраны -60 мВ. (Из работы [21] с разрешения авторов.)

ся на потенциале, а следовательно, не изменяется и поглощение красителя. Это так называемая «нулевая точка» по K^+ [34]; подставив в уравнение (1) значения концентрации K^+ в среде и в цитоплазме ($[K^+]_н$ и $[K^+]_в$), мы получим значение трансмембранного потенциала. Коль скоро валиномицин влияет на потенциал в используемых условиях, нулевая точка по K^+ может быть получена любым из двух представленных на рис. 7.6 способов.

3. После добавления к клеткам валиномицина и установления нового равновесного состояния увеличивают концентрацию K^+ в среде добавлением небольших порций концентрированного KCl (4M, по-видимому, наиболее удобная концентрация; рис. 7.6).

4. Измеряют поглощение при нескольких значениях концентрации внеклеточного K^+ и путем интерполяции получают нулевую точку. Обычно для этого достаточно просто продолжить соответствующую кривую на глаз, не прибегая к методу наименьших квадратов, особенно если теоретическая зависимость поглощения красителя от потенциала неизвестна.

При такой постановке эксперимента для определения потенциала нужна только одна проба с образцом, что позволяет экономить время и дорогостоящие препараты. Альтернативная постановка опыта состоит в инкубации клеток в среде с разной концентрацией K^+ и в регистрации изменений в ответ на добавление валиномицина (рис. 7.6). Нулевую точку по K^+ тоже получают путем интерполяции. Этот способ можно использовать только для клеток с довольно низкой проницаемостью для K^+ ; клетки с более высокой проницаемостью деполаризуются в среде с большим содержанием этого иона и последующее добавление валиномицина уже почти ничего не меняет. При любой постановке эксперимента для получения точной оценки потенциала необходимо знать концентрацию K^+ в цитоплазме. Для этого осаждают клетки через смесь, содержащую ди-н-бутилфталат (две части) и динонилфталат (одна часть) с плотностью 1,02; в такой среде клетки осаждаются после центрифугирования в микроцентрифуге В (Вескман) в течение 10 с. Концентрацию катионов в клетках определяют (предварительно оценив содержание воды; влажный вес минус сухой вес) с помощью атомной абсорбционной спектроскопии. Количество среды, просочившейся в осадок клеток, обычно составляет менее 0,05%, но и его можно контролировать, добавив в инкубационную среду какой-либо внеклеточный маркер, например $[^{14}C]$ -инсулин.

Существует опасность, что липофильный комплекс валиномицин/ K^+ будет связывать липофильные анионы, например оксонольные красители, поэтому описанную выше калибровку же-

лательно провести с другим ионофором. Для этого полезен разобщитель ФКФ, избирательно увеличивающий протонную проводимость мембран. По своей постановке эксперименты по измерению потенциала с помощью ФКФ и с помощью валиномицина одинаковы с той лишь разницей, что теперь добавлением кислоты или основания варьируют рН среды, а не концентрацию K^+ (рис. 7.7). Чтобы оценить мембранный потенциал с использованием нулевой точки по рН, необходимо знать рН внутри клетки (обычно он близок к 7,1), который в свою очередь можно определить с помощью индикаторов рН (см. ниже).

3.3. рН клеточных компартментов

3.3.1. рН эндосом

Большинство эукариотических клеток путем эндоцитоза поглощает компоненты собственной плазматической мембраны и связанный с ней экзогенный материал. Дальнейшая судьба эндосом может быть довольно сложной, но обычно их превращения включают этап, на котором происходит повышение рН интравезикулярной среды [35]. рН внутри таких эндосом можно прямо измерить, если присоединить рН-чувствительный краситель либо к соответствующему участку мембраны, либо к подходящему экстраклеточному компоненту, захватываемому при эндоцитозе. Для этой цели чаще всего используют флуоресцеин, поскольку он хорошо виден во флуоресцентный микроскоп, а его изотиоцианатное производное можно ковалентно пришить к аминок группам белков (для опосредуемого рецептором эндоцитоза) или к декстрану. Кроме того, флуоресценция свободного и связанного флуоресцеина чувствительна к рН в диапазоне от 4,5 до 7,5 [18]. Инкубируя клетки в подходящей физиологической среде с красителем, можно наполнить эндосомы производными флуоресцеина, а затем освободиться от экстраклеточного красителя отмыванием (табл. 7.3). Процедура калибровки флуоресценции представлена на рис. 7.8, А: после измерения интенсивности флуоресценции устанавливают рН всех клеточных компартментов на уровне, равном рН среды, добавлением ионофора моненсина; затем постепенно уменьшают рН среды до тех пор, пока интенсивность флуоресценции не станет равной исходной. Значение рН среды, при котором это происходит, равно начальному рН внутри эндосомы. Основная трудность данной методики связана с флуоресценцией самих клеток, которая тоже может оказаться рН-зависимой.

Более точную оценку рН внутри эндосом можно получить, следя за распределением проникающих в эндосомы аминов, например 9-аминоакридина или акридинового оранжевого, флуо-

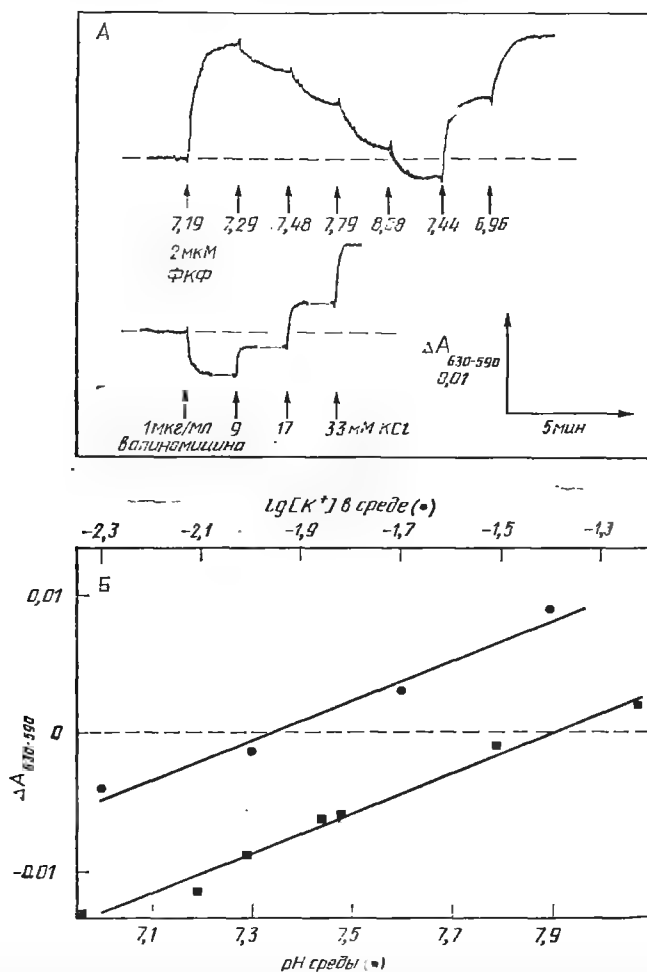


Рис. 7.7. А. Измерение мембранного потенциала лимфоцитов с помощью оксонола-V. Лимфоциты суспендировали до концентрации 10^7 клеток/мл в среде, содержащей 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, $2 \cdot 10^{-6}$ М оксонол-V, pH доводили до 7,4 раствором NaOH при 37°C. FKФ и NaOH или HCl (верхняя кривая) либо валиномициии и KCl (нижняя кривая) добавляли до указанных конечных концентраций или pH. Б. Зависимость от pH разности между поглощением оксонола-V до и после добавления FKФ (квадратики) и зависимость от концентрации K^+ изменений поглощения до и после добавления валиномициии (кружки). Концентрации H^+ и K^+ , при которых добавление FKФ или валиномициии соответственно не приводит к изменениям поглощения, определяют в точках пересечения кривых с базовой линией (пунктир). В данном случае «нулевая точка» по K^+ составляет 11 mM, а по pH — 7,91; внутриклеточная концентрация K^+ равна 102 mM, а pH — 7,0; следовательно, мембранные потенциалы равны соответственно -59 и -56 мВ. (Из работы [21] с разрешения авторов.)

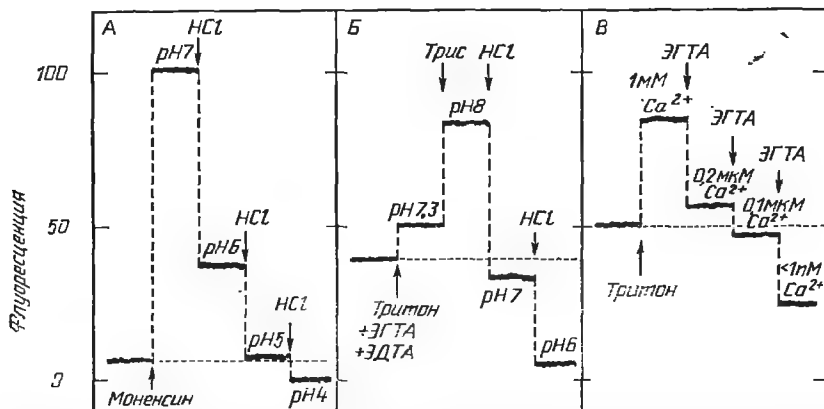


Рис. 7.8. Калибровка внутриклеточных зондов pH и Ca^{2+} . А. Клетки, окрашенные флуоресцеинном/декстраном (табл. 7.3; [18]), суспендировали в уравновешенной солевой среде Хенка, содержащей 20 мМ HEPES, pH 7,0 (NaOH). Для возбуждения флуоресценции использовали свет с длиной волны 493 нм (ширина щели 6 нм), а регистрировали флуоресценцию при 520 нм (ширина щели 10 нм) в режиме «отщепление» на флуориметре Perkin-Elmer MPF4. Для калибровки исходного сигнала (6 единиц) вначале добавляли моненсин до конечной концентрации 1 мкг/мл, чтобы выровнять pH всех компартментов системы [18], а затем последовательными добавлениями HCl доводили pH суспензии до указанных значений. Исходная интенсивность флуоресценции клеток восстанавливалась в присутствии моненсина при pH 4,8, т. е. флуоресцеин/декстран локализован в компартменте с pH 4,8. Все сигналы необходимо скорректировать с учетом флуоресценции неокрашенных клеток, а также измерить флуоресценцию супернатанта (в данном случае она оказалась пренебрежимо малой, <10% от флуоресценции в присутствии клеток). Б. Тимоциты, окрашенные квеином-1 (табл. 7.4; [9]), суспендировали до концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток/мл в культуральной среде RPMI 1640 (без фенолового красителя) с добавлением глюкозы (11 мМ) и HEPES (10 мМ), pH 7,3 (NaOH), температура 37°C. Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 390 нм (ширина щели 10 нм) и регистрировали при 530 нм (ширина щели 10 нм) на спектрофлуориметре Perkin-Elmer 44B. Для калибровки сигнала (49 единиц) клеточную мембрану разрушали 0,05%-ным тритоном X-100 в присутствии 0,5 мМ ЭГТА и 0,5 мМ ЭДТА (эти хелатирующие агенты уменьшают концентрацию свободных Ca^{2+} и Mg^{2+} до уровня, при котором они не оказывают влияния на pH-зависимую флуоресценцию квеина-1 [9] и предотвращают тушение флуоресценции ионами каких-либо других металлов). После обработки тритоном в среду высвобождается более 90% красителя, который можно оттитровать с помощью трис и HCl (значения pH указаны над кривыми). Интенсивности флуоресценции до и после добавления тритона совпадают при pH 7,1; следовательно, при pH среды 7,3 pH цитоплазмы составляет 7,1. В. Окрашенные квеином-2 лимфоциты (табл. 7.4; [8]) суспендировали до концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток/мл в среде, содержащей 130 мМ KCl, 20 мМ NaCl, 1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgCl_2 , 5 мМ глюкозу, 10 мМ MOPS, pH 7,4 (NaOH). Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 339 нм (ширина щели 4 нм) и регистрировали при 500 нм (ширина щели 10 нм) на спектрофлуориметре Perkin-Elmer MPF 44B. Для калибровки сигнала увеличивали проницаемость клеток с помощью 0,05%-ного тритона X-100, а затем титровали среду ЭГТА, MgCl_2 и KOH, доводя концентрацию Ca^{2+} до 0,2 и $0,1 \cdot 10^{-6}$ М, как указано над кривой, в присутствии 1 мМ свободного Mg^{2+} , pH 7,05 [8]. «Нулевая точка» по

ресценция которых зависит от концентрации. Эти амины накапливаются в компартментах с кислым содержимым, поскольку протонированная форма красителя значительно хуже проходит через мембрану, чем свободное основание. Если происходит быстрое установление равновесия по непротонированной форме красителя между содержимым эндосомы и средой, то рН внутри везикулы определяется следующим соотношением [7]:

$$\text{pH}_v = \text{pH}_n - \lg ([\text{AH}^+]_v / [\text{AH}^+]_n). \quad (3)$$

В норме $\text{pH}_n < \text{p}K - 1$, поэтому $[\text{AH}^+] \approx [\text{AH}^+] + [\text{A}]$. 10 мМ раствор 9-аминоакридина флуоресцирует в желтой области спектра [4], а акридиновый оранжевый — в красной, но не в голубой области (низкие концентрации красителя). В клетках, инкубированных с 0,01 мМ 9-аминоакридином, под флуоресцентным микроскопом наблюдается множество желтых везикул; это везикулы, в которых концентрация красителя по крайней мере на два порядка выше, чем в среде, а значит, рН в них должен составлять ~5—6.

3.3.2. рН или $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитоплазме или в изолированных мембранных везикулах

С помощью «пойманных в ловушку» красителей можно также измерять рН или концентрацию ионов кальция в цитоплазме или в изолированных компартментах. Для этой цели удобны индикаторы типа квен-1 [9] или квин-2 [8].

1. Нагружают клетки красителем. Для этого добавляют ацетоксиметилловый эфир красителя, который проникает через плазматическую мембрану в цитоплазму, где затем гидролизруется клеточными эстеразами до непроникающей кислой формы (табл. 7.4).

2. Следят за ходом дезэтерификации по постепенному изменению спектра флуоресценции, а именно — по исчезновению флуоресценции эфира и параллельному появлению флуоресценции кислоты. При этом важно поддерживать рН цитоплазмы вблизи 7, где активность эстераз оптимальна. Кроме того, поскольку при гидролизе образуется кислота, лучше всего включать в инкубационную среду бикарбонаты [9].

3. По окончании инкубации промывают клетки, чтобы флуоресценция среды уменьшилась до минимума. Наблюдающаяся после этого флуоресценция связана с красителем, находящимся в цитоплазме. Слишком интенсивное отмывание может при-

Ca^{2+} (<1 нМ) достигается при концентрации ЭГТА 2 мМ и $\text{pH} > 8,3$. Каждый раз учитывали вклад флуоресценции неокрашенных клеток и не разрушенных трионом лимфоцитов. Содержание внутриклеточного Ca^{2+} составило 150 нМ.

Все кривые на этих рисунках построены по данным работ [8, 9, 18].

Таблица 7.3. Окраска эндосом производными флуоресцина

1. Клетки инкубируют при 37 °C в культуральной среде, содержащей производные флуоресцина (концентрация ~1 мг/мл). Молекулы красителя быстро (~10 мин) проникают в клетки, а затем поглощаются вторичными лизосомами [35]. При температурах ниже физиологических эндоцитоз и внутриклеточный мембранный транспорт сильно замедляются. При 4 °C происходит только связывание лигандов с клеточной поверхностью, поэтому при низкой температуре можно «включить» рецепторы молекулами красителя, а затем, повысив температуру, «включить» эндоцитоз.
2. Внеклеточный краситель удаляют промыванием клеток холодной (4 °C) культуральной средой. За наблюдающуюся после этого флуоресценцию ответствен краситель, локализованный в клетках.
3. Окрашенные клетки помещают во флуоресцентный микроскоп или флуориметр и измеряют интенсивность флуоресценции. Флуоресценцию прикрепленных к твердому субстрату клеток можно исследовать с помощью световодов (рис. 7.1) либо стандартного флуориметра, поместив пластинку с субстратом по диагонали во флуоресцентную кювету (полученная конструкция напоминает оптическую систему, используемую для регистрации флуоресценции непрозрачных или сильно поглощающих образцов). При этом важно во время калибровки сигнала не сдвигать образец с места.
4. Меняя pH среды в присутствии моненсина, проводят калибровку сигнала (см. рис. 7.8, А).

вести к удалению также и внутриклеточного красителя, особенно если имеется небольшая «утечка». Было показано, что оптимальная процедура состоит в непродолжительном высокоскоростном центрифугировании клеток на микроцентрифуге, быстрое их ресуспендировании и проведении калибровки [8].

4. После установления стационарного состояния можно подвергать клетки действию тех или иных агентов и наблюдать за изменениями флуоресценции.

5. Проводят калибровку сигнала флуоресценции (рис. 7.8, Б, В). Для этого с помощью дигитонина или тритона X-100 делают клетки проницаемыми (если измеряется pH — в присутствии 0,5 мМ ЭГТА и 0,5 мМ ЭДТА, хелатирующих ионы металлов, которые являются сильными тушителями флуоресценции), а затем титруют суспензию ионами H^+ или Ca^{2+} до тех пор, пока не будет наблюдаться такая же интенсивность флуоресценции, что и без детергента.

Несколько слов о мерах предосторожности при мытье кювет: хромовая смесь может содержать тушители флуоресценции. Избавиться от них можно, просто сполоснув кювету раствором какого-либо хелатирующего агента, например ЭДТА.

К сожалению, некоторые клетки, по-видимому, не могут удерживать очень долго кислые формы таких pH- и Ca^{2+} -индикаторных красителей, даже если мембрана непроницаема для свободной кислоты. Поэтому очень важно проверить, действительно ли наблюдаемая флуоресценция связана с содержимым клеток. Лучше всего это сделать, осадив часть суспензии и про-

Таблица 7.4. Окрашивание цитоплазмы с помощью ацетоксиметиловых эфиров Ca^{2+} - или pH-чувствительных индикаторных красителей

1. Готовят 10 мМ раствор ацетоксиметилового эфира красителя квин-2 (для измерения концентрации Ca^{2+}) или квен-1 (для измерения pH) в ДМСО.
2. Инкубируют клетки при 37 °C в изотоническом забуференном физиологическом растворе и добавляют 10 мМ раствор индикатора до концентрации примерно $1-5 \cdot 10^{-6}$ М ($\sim 0,1-0,5$ нмоль индикатора/ 10^6 клеток). Конечная концентрация ДМСО менее 0,5% (по объему).
3. За ходом гидролиза эфира следят по спектрам флуоресценции суспензии клеток. При появлении свободной кислотной формы максимум флуоресценции красителя сдвигается в голубую область (более короткие длины волн) [8, 9].
4. После достижения степени гидролиза 80% или более (обычно через 30—90 мин) клетки осаждают центрифугированием; осадок ресуспенсируют в среде без красителя и инкубируют еще 30 мин при 37 °C.
5. Осаждают клетки еще раз и ресуспенсируют в среде для проведения флуоресцентных измерений.
6. Меняя pH или концентрацию Ca^{2+} в среде, как показано на рис. 7.8, Б, В, калибруют сигнал флуоресценции.
Если окрашивание цитоплазмы происходит медленно, в среду для инкубации добавляют бикарбонат. Это позволяет поддерживать pH внутри клеток вблизи 7 — условия, при которых активность цитоплазматических эстераз максимальна.

верив, содержит ли супернатант краситель (контроль на флуоресценцию супернатанта). Если утечка все же происходит, разумные данные можно получить, проинкубировав клетки с эфиром красителя лишь очень недолгое время (значительно меньшее, чем нужно для полного гидролиза эфира), быстро отмыв клетки и немедленно проделав описанные выше процедуры по определению pH или концентрации Ca^{2+} . К сожалению, это приводит к неизбежному увеличению расхода довольно дорогого исходного материала.

С помощью проникающих индикаторов можно измерить pH цитоплазмы только при условии, что вклад во флуоресценцию, вносимый внеклеточным красителем, соответствующим образом компенсирован. Для такой цели лучше всего подходит нейтральный красный. Он легко проникает внутрь клетки, а если pH среды достаточно стабилен, любые изменения интенсивности флуоресценции можно отнести к изменениям pH в замкнутом компартменте [36]. На рис. 7.9 показаны результаты типичного эксперимента по измерению абсолютного значения внутриклеточного pH с помощью нейтрального красного. Эксперименты проводят по следующей схеме.

1. Инкубируют клетки (в данном случае используется так называемая линия Леттре клеток асцитной опухоли) в содержащем HEPES физиологическом растворе в присутствии 0,025 мМ нейтрального красного при комнатной температуре (при концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток/мл примерно 50% красителя ассоциировано с клетками) и записывают спектр (спектр 1).

2. Осаждают клетки и регистрируют спектры поглощения супернатанта (спектр 2). Спектр 3 — разность двух первых спектров — представляет собой спектр ассоциированного с клетками красителя.

3. Вычисляют рН в каждом компартменте по стандартной калибровочной кривой, полученной с помощью спектров растворов нейтрального красного с известными значениями рН.

В качестве параметра было выбрано отношение поглощения кислой формы красителя (A_{530}) к поглощению в изобестической точке (A_{477}), поскольку оно подчиняется уравнению Гендерсона — Хассельбальха и не зависит от концентрации красителя [4]. рН цитоплазмы клеток Лейтте в таких условиях был равен 7,01. Мы предполагали, что pK_a и спектральные свойства ассоциированного с клетками красителя идентичны свойствам свободного красителя. Это предположение еще предстоит проверить. Однако полученное нами с помощью индикаторов значение рН неплохо согласуется с рН, полученным двумя независи-

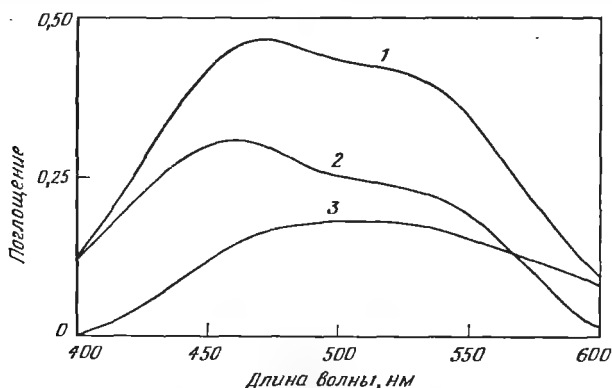


Рис. 7.9. Измерение рН клеток Лейтте с помощью нейтрального красного. На сканирующем двухволновом спектрофотометре (Applied Photophysics Ltd., London) регистрировали и записывали в цифровой памяти компьютера спектры поглощения четырех образцов: (I) спектр среды, содержащей 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 5 мМ HEPES, 1 мМ $MgSO_4$, рН 7,3, используемый как базовая линия для спектра 2; (II) спектр среды, содержащей $3 \cdot 10^6$ клеток Лейтте в 1 мл, используемый как базовая линия для спектра 1; (III) спектр среды, содержащей $3 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл и $4 \cdot 10^{-5}$ М нейтральный красный; (IV) спектр супернатанта, образовавшегося после центрифугирования среды III в течение 1 мин при 16 000 г в бекмановской микроцентрифуге В. Представлены следующие разностные спектры: спектр 1=III–II, спектр внеклеточного и внутриклеточного нейтрального красного; спектр 2=IV–I, спектр внеклеточного нейтрального красного; спектр 3=(III–II)–(IV–I), спектр внутриклеточного нейтрального красного (представляет собой разность спектров 1 и 2). рН внутри и снаружи клеток вычисляли из отношения поглощения при 530 нм к поглощению при 477 нм [4]. Для спектра 2 (внешний объем) $A_{530}/A_{477}=0,768$, рН=7,32. Для спектра 3 (внутриклеточное пространство) $A_{530}/A_{477}=1,032$, рН=7,01.

мыми методами, а именно — с помощью ^{31}P -ЯМР и по данным о направлении утечки катионов из клеток, проницаемость которых индуцировали вирусом Сендай [37].

3.4. Поверхностный потенциал мембран

Обычно биологические мембраны несут суммарный отрицательный заряд из-за присутствия на поверхности липидных и белковых молекул кислых групп (фосфатных, сульфатных, карбоксильных). Абсолютное значение отрицательного заряда (поверхностного потенциала) прямо определить невозможно, но электрофоретические измерения [38—40] позволяют оценить дзета-потенциал, равный разности потенциалов между границей подвижной части двойного электрического слоя и водной фазой, а также поверхностную плотность зарядов. Экспонированные на поверхности мембраны ферменты и рецепторы прямо или опосредованно, через взаимодействие с адсорбированными катионами, могут «чувствовать» изменения поверхностного потенциала.

В качестве зондов для измерения поверхностного потенциала мембран использовали несколько хромофоров. Идея эксперимента предельно проста. Амфифильный хромофор будет связываться с гидрофобными сайтами на поверхности клетки. Изменение окружающего хромофор растворителя прямо влияет на спектр флуоресценции и поглощения, поэтому свободный и мембраносвязанный красители можно различить оптическими методами. А если краситель заряжен, то поверхностный потенциал будет непосредственно влиять на сродство красителя к мембране (положительно заряженные зонды связываются сильно, отрицательно заряженные — слабо). При изменении поверхностного потенциала сродство красителя к поверхности будет меняться, что несложно зарегистрировать по изменению его оптических свойств. Так, в качестве зонда, чувствительного к изменениям поверхностного заряда мембран хлоропластов, использовали 9-аминоакридин (положительно заряженный краситель) [19, 41]; флуоресценция связанного с мембраной красителя пренебрежимо мала. 1-анилино-8-нафталинсульфонат (АНС, отрицательно заряженный краситель) применяли при исследовании митохондриальной и других мембран [42—44]; в данном случае свободный краситель обладал крайне низкой интенсивностью флуоресценции. Уменьшение поверхностного потенциала приводило к разгоранию флуоресценции 9-аминоакридина (высвобождение слабо флуоресцирующего связанного красителя в среду) и АНС (связывание красителя с мембраной, приводящее к увеличению квантового выхода флуоресценции).

Недостаток рассмотренных методов состоит в том, что флуоресценция этих красителей чувствительна ко многим факторам, например к трансмембранному распределению зондов, и доказать, что регистрируется только поверхностный потенциал, крайне трудно. Кроме того, в отличие от трансмембранного потенциала, который с помощью ионофоров можно изменить на заранее заданную величину, поверхностный потенциал невозможно модулировать столь же простым способом; это не позволяет осуществить точную калибровку сигнала.

4. Перспективы

Элегантность и простота оптических экспериментов позволяют надеяться, что фотометрические и флуориметрические методы изучения функций мембран получат дальнейшее развитие. Число работ, посвященных исследованию поведения индивидуальных клеток в сложных надклеточных системах, возрастает. Так, оптические зонды, чувствительные к мембранному потенциалу, оказались очень удобными для исследования синаптических сетей как в простых [45, 46], так и в более сложных системах [47]. Новые индикаторы pH и концентрации Ca^{2+} в клетке позволяют уяснить роль этих катионов в стимуляции и дифференцировке клеток [48], опять-таки с акцентом на изучение единичных клеток. И наконец, благодаря универсальности рассмотренных методов уже существующие методики можно применять для изучения систем, анализ которых более сложными методами затруднен. Это позволит всесторонне исследовать самые разные биологические объекты.

5. Благодарности

Мне хотелось бы поблагодарить Mrs. B. J. Bashford за ее терпение при подготовке рисунков, а также Royal Society и the Cell Surface Research Fund за финансовую поддержку.

Литература

1. Keilin D. (1925). *Proc. R. Soc. Lond. B*, **98**, 312.
2. Jackson J. B., Crofts A. R. (1969). *FEBS Lett.*, **4**, 185.
3. Cohen L. B., Salzberg B. M., Davila H. V., Ross W. N., Landowne D., Waggoner A. S., Wang C. H. (1974). *J. Membr. Biol.*, **19**, 1.
4. Harris D. A., Bashford C. L., eds. (1987). *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry — A Practical Approach*. IRL Press, Oxford and Washington, DC.
5. Johnson L. V., Walsh M. L., Bockus B. J., Chen L. B. (1981). *J. Cell Biol.*, **88**, 526.
6. Reijngoud D. J., Tager J. M. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, **297**, 174.
7. Rottenberg H. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 547.
8. Tsien R. Y., Pozzan T., Rink T. J. (1982). *J. Cell Biol.*, **94**, 325.

9. Rogers J., Hesketh T. R., Smith G. A., Metcalfe J. C. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 5994.
10. Kauppinen R. A., Hassinen I. E. (1984). *Am. J. Physiol.*, **247**, H508.
11. Montecucco C., Pozzun T., Rink T. J. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **552**, 552.
12. Miller J. N. (1981). *Standards in Fluorescence Spectrometry*. Chapman and Hall, London.
13. Bungham A. D., De Gier J., Greville G. D. (1967). *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 225.
14. Chance B., Williams G. R. (1955). *J. Biol. Chem.*, **217**, 395.
15. Chance B., Schoener B., Oshino O., Itshak F., Nakase Y. (1979). *J. Biol. Chem.*, **254**, 4764.
16. Harbig K., Chance B., Kovach A. G. B., Reivich M. (1976). *J. Appl. Physiol.*, **41**, 480.
17. Waggoner A. S. (1979). *Methods Enzymol.*, **55**, 689.
18. Geisow M. J. (1984). *Exp. Cell Res.*, **150**, 29.
19. Barber J. (1986). In: *Interactions in Energy Transfer Biomembranes*, Papa-georgiou G. C., Barber J., Papa S. (eds.), Plenum Press, London, p. 15.
20. Akerman K. E. O., Wikstrom M. K. F. (1976). *FEBS Lett.*, **68**, 191.
21. Bashford C. L., Alder G. M., Gray M. A., Micklem K. J., Taylor C. C., Turek P. J., Pasternak C. A. (1985). *J. Cell. Physiol.*, **123**, 326.
22. Estabrook R. W. (1956). *J. Biol. Chem.*, **223**, 781.
23. Jones C. W., Poole R. K. (1985). In: *Methods in Microbiology*. Gottschalk G. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 18, p. 285.
24. Poole R. K., Chance B. (1981). *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 277.
25. Bashford C. L., Barlow C. H., Chance B., Haselgrove J. C., Sorge J. (1982). *Am. J. Physiol.*, **242**, C265.
26. Jobsis F. F., Keizer J. H., LaManna J. C., Rosenthal M. (1977). *J. Appl. Physiol.*, **43**, 858.
27. Wollenberger A., Ristau O., Schoffa G. (1960). *Pflugers Arch. ges. Physiol.*, **270**, 399.
28. Epstein F. H., Balaban R. S., Ross B. D. (1982). *Am. J. Physiol.*, **243**, F356.
29. Bashford L., Stubbs M. (1986). *Biochem. Soc. Trans.*, **14**, 1213.
30. Bashford C. L., Barlow C. H., Chance B., Haselgrove J. (1980). *FEBS Lett.*, **113**, 78.
31. Bashford C. L. (1981). *Biosci. Rep.*, **1**, 183.
32. Bashford C. L., Chance B., Prince R. C. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **545**, 46.
33. Smith J. C., Russ P., Cooperman B. S., Chance B. (1978). *Biochemistry*, **15**, 5094.
34. Hoffman J. C., Laris P. C. (1974). *J. Physiol. (Lond)*, **239**, 519.
35. Geisow M. J., Evans W. H. (1984). *Exp. Cell Res.*, **150**, 36.
36. Junge W. W., Auslander W., McGeer A. J., Runge T. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **546**, 121.
37. Bashford C. L., Alder G. M., Micklem K. J., Pasternak C. A. (1983). *Biosci. Rep.*, **3**, 631.
38. Bangham A. D., Flemans R., Heard D. H., Seaman G. V. F. (1958). *Nature*, **182**, 642.
39. Bangham A. D., Pethica B. A., Seaman G. V. F. (1958). *Biochem. J.*, **69**, 12.
40. Heard D. H., Seaman G. V. F. (1960). *J. Gen. Physiol.*, **43**, 635.
41. Chow W. S., Barber J. (1980). *J. Biochem. Biophys. Methods*, **3**, 173.
42. Haynes D. H. (1974). *J. Membr. Biol.*, **17**, 341.
43. Wojtczak L., Nalecz M. J. (1979). *Eur. J. Biochem.*, **94**, 99.
44. Robertson D. E., Rottenberg H. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 11039.
45. Grinvald A., Salzberg B. M., Cohen L. B. (1977). *Nature*, **268**, 140.

46. Grinvald A., Cohen L. B., Leshner S., Boyle M. B. (1981). *J. Neurophysiol.*, **45**, 829.
47. Blasdel G. G., Salama G. (1986). *Nature*, **321**, 579.
48. Poenie M., Alderton J., Tsien R. V., Steinhardt R. A. (1985). *Nature*, **315**, 147.
49. Clayton R. K. (1980). *Photosynthesis: Physical Mechanisms and Chemical Patterns*. Cambridge University Press, Cambridge.
50. Telfer A. (1986). In: *Ion Interactions in Energy Transfer Biomembranes*. Papageorgiou G. C., Barber J., Papa S. (eds.), Plenum Press, New York, p. 201.
51. Schuldiner S., Rottenberg H., Avron M. (1972). *Eur. J. Biochem.*, **25**, 64.
52. Kogure K., Alonso O. F., Martinez E. (1980). *Brain Res.*, **195**, 95.
53. LaManna J. C., McCracken K. A. (1984). *Anal. Biochem.*, **142**, 117.
54. Ashley C. C., Campbell A. K. (1979). *Detection and Measurement of Free Ca^{2+} in Cells*. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
55. Scarpa A. (1972). *Methods Enzymol.*, **24**, 322.
56. Azzi A., Chance B., Radda G. K., Lee C. P. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **62**, 612.
57. Brocklehurst J. R., Freedman R. B., Hancock D. J., Radda G. K. (1970). *Biochem. J.*, **116**, 721.
58. Bashford C. L., Radda G. K., Ritchie G. A. (1975). *FEBS Lett.*, **50**, 21.
59. Bashford C. L., Casey R. P., Radda G. K., Ritchie G. A. (1976). *Neuroscience*, **1**, 399.
60. Flanagan M. T., Hesketh T. R. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 535.
61. Shinitzky M., Barenholz Y. (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 2652.
62. Shinitzky M., Inbar M. (1974). *J. Mol. Biol.*, **85**, 603.
63. Bashford C. L., Harrison S. J., Radda G. K., Mehdi Q. (1975). *Biochem. J.*, **146**, 473.
64. Bashford C. L., Morgan C. G., Radda G. K. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 157.
65. Thulborn K. R., Sawyer W. H. (1978). *Biochim. Biophys. Acta*, **511**, 125.
66. Bashford C. L., Foster K. A., Micklem K. J., Pasternak C. A. (1981). *Biochem. Soc. Trans.*, **9**, 80.
67. Kerr S. E. (1935). *J. Biol. Chem.*, **110**, 625.
68. Dutton P. L., Petty K. M., Bonner H. S., Morse S. D. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 536.
69. Chance B., Graham N. (1971). *Rev. Sci. Instrum.*, **42**, 941.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Дитер Шуберт

1. Введение

Биофизические методы внесли и безусловно будут вносить и впредь значительный вклад в изучение биомембран. Теоретические основы большинства биофизических методов и использующиеся при этом приборы и способы обработки данных весьма сложны, поэтому мы не можем в рамках данной книги подробно рассмотреть обычно применяющиеся подходы. Большинство экспериментов с использованием биофизических методов может проводиться только специалистами, и в данной главе мы уделим основное внимание не деталям подобных экспериментов, а их возможностям и ограничениям. При этом предпочтение будет отдано методам, непосредственно применимым к изучению мембранных белков (в отличие от тех, для которых, например, необходимо присутствие специфических внутренних хромофоров; см. гл. 7). Эта глава предназначена не для специалистов в области биофизики, а для тех, кто слабо представляет, какого рода информацию можно получить с помощью того или иного метода.

2. Размеры, форма и конформация мембранных белков и их комплексов

Большинство описанных в этом разделе методов нельзя применять к изучению мембранных белков в их естественном окружении — в составе мембран, требуется их солюбилизация, а нередко и очистка. Ясно, что значимую структурную информацию можно получить только при условии, что в результате солюбилизации и очистки конформация белка существенно не изменяется. К счастью, для периферических мембранных белков это не столь большая проблема, иное дело — интегральные белки. В этом случае, вероятно, для выделения лучше всего использовать подходящие неионные детергенты, поскольку в таких растворах и укладка полипептидной цепи, и белок-белковые взаимодействия, по-видимому, остаются такими же, как и в натив-

ных мембранах (гл. 5). С помощью этого подхода и применения биофизических методов можно получить столь же значимые результаты, что и в случае растворимых белков [1].

2.1. Молекулярная масса мономерных белков или субъединиц

Сейчас молекулярную массу полипептидов определяют почти исключительно с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН. В отличие от классических методов, таких, как аналитическое ультрацентрифугирование, рассеяние света, малоугловое рентгеновское рассеяние или осмометрия, гель-электрофорез не требует столь дорогостоящего оборудования или изощренных процедур обработки полученных данных. Не нужны также большие количества высокоочищенного белка: можно определить даже молекулярную массу белков — минорных компонентов пробы. Более того, ДСН — это наиболее эффективный реагент для солиubilизации мембранных белков и деполимеризации белковых комплексов. Подробно эти методы описаны в другой книге данной серии [2] (см. также гл. 6).

Гель-электрофорез в ПААГ с ДСН безусловно является наиболее полезным методом определения молекулярных масс, однако необходимо отметить, что он не только не имеет какого-либо теоретического обоснования, но и в некоторых случаях вообще неприменим [1]. В частности, определение молекулярных масс гликопротеинов с высоким содержанием углеводов обычно приводит к неверным результатам. Нужно также иметь в виду, что в присутствии ДСН не всегда образуются только мономерные белковые субъединицы ([1]; см. гл. 6). В случае гликопротеинов неплохие результаты при определении молекулярных масс дает аналитическое ультрацентрифугирование в растворах ДСН с последующим измерением связывания детергента [1]. Если необходимо, чтобы белок находился в мономерной форме в неионном детергенте, можно применить описанную ниже методику для белковых комплексов. Гораздо сложнее ответить на вопрос, достигается ли в ДСН полная деполимеризация. Если такое сомнение возникает, необходимо применить совместно гель-электрофорез в ДСН, аналитическое ультрацентрифугирование в различных денатурирующих условиях и количественный анализ концевых групп.

2.2. Молекулярная масса белковых комплексов

2.2.1. Химическое сшивание

Техника химического сшивания белковых комплексов в интактной мембране и последующее определение молекулярной массы сшитых агрегатов с помощью гель-электрофореза в ДСН

позволяют получить информацию о размерах комплекса в нативных условиях, что весьма важно для исследования организации мембранных белков. Детальное описание этой методики дано в гл. 6; введение в проблему можно найти также в статье [3]. Отметим два важных аспекта такого подхода. 1. Хотя положительный результат — образование сшивки между двумя белковыми молекулами — может служить достаточно веским доводом в пользу существования комплекса *in vivo*, отрицательный результат не всегда означает, что ассоциация отсутствует. 2. Изучая мембранные системы, трудно или почти невозможно ответить на вопрос, образуются ли стабильные комплексы или устанавливается динамическое равновесие. В случае солюбилизованных комплексов эту дилемму можно решить, проанализировав влияние концентрации белка на процесс образования сшивок. С другой стороны, образование сшивок в результате случайных столкновений между белковыми молекулами, ранее считавшееся весьма вероятным, по-видимому, все-таки не является столь частым событием [4, 5].

2.2.2. Аналитическое ультрацентрифугирование

Аналитическое ультрацентрифугирование — изучение движения и распределения растворенных макромолекул в гравитационном поле — представляет собой классический метод определения их молекулярной массы. Хотя этот способ сейчас менее популярен, чем раньше, он, вероятно, остается лучшим методом определения молекулярной массы комплексов мембранных белков, особенно если количество белка ограничено. Детальное описание этого метода можно найти в другой книге данной серии [6]. Здесь мы кратко остановимся лишь на тех аспектах, которые особенно важны при исследовании мембранных белков.

1. Если центрифуга снабжена УФ-сканирующей системой, можно изучать растворы белков с концентрацией менее 100 мкг/мл (при объеме пробы ~150 мкл на пробирку). Это позволяет не только уменьшить необходимое количество чистого материала, но и в большинстве случаев считать раствор идеальным, что значительно упрощает обработку экспериментальных данных.

2. Если исследуются периферические мембранные белки, которые можно изучать в отсутствие детергентов, то их молекулярную массу можно определить, измеряя скорость седиментации и коэффициент диффузии, с одной стороны, и проводя равновесный седиментационный анализ — с другой. Для интегральных мембранных белков, требующих присутствия неионных детергентов, наиболее удобен анализ седиментационного равновесия, поскольку при этом проще всего учесть вклад связанного с белком детергента.

3. Опыты по определению седиментационного равновесия белков в неионных детергентах позволяют определить массу как комплекса белок—детергент, так и чистого белка. Для этого варьируют плотность растворителя, используя различные смеси $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. Молекулярную массу чистого белка можно определить, либо используя растворитель, плотность которого сопоставима с плотностью детергента, либо экстраполируя данные к этой плотности. Для этого, правда, необходимо еще знать удельный объем белковой глобулы. Чтобы можно было подобрать соответствующую плотность растворителя, плотность детергента должна составлять 1,0—1,1 г/мл. К счастью, для большинства стандартных неионных детергентов, включая детергенты серии бридж и тритон X-100, это условие выполняется [1].

4. Смесь олигомерных агрегатов одного полипептида или белковых комплексов можно изучать, анализируя с применением метода наименьших квадратов профиль зависимости концентрации от радиуса после установления седиментационного равновесия. Это позволяет оценить размеры олигомерных форм и их долю. Кроме того, проводя эксперименты при различных концентрациях белка или при разных скоростях центрифугирования, можно выяснить, являются ли олигомеры стабильными или находятся в равновесии друг с другом [7]. На рис. 8.1 представлены результаты эксперимента по аналитическому ультрацентрифугированию.

2.2.3. Методы, основанные на рассеянии излучения растворами

Для определения молекулярной массы частиц можно использовать метод малоуглового рентгеновского рассеяния или рассеяния тепловых нейтронов растворами макромолекул или их комплексов. Значение молекулярной массы вычисляют, зная интенсивность рассеяния в центральном максимуме, кривую рассеяния на очень малые углы и экстраполируя эти данные к нулевому углу. Аналогичную информацию можно получить из экспериментов по рассеянию света (на любые углы). Во всех этих случаях необходимо знать удельный объем белковой глобулы. Как и для аналитического ультрацентрифугирования, при определении молекулярной массы по рассеянию в растворах возникают проблемы, связанные с вкладом ассоциированных с белком молекул детергента. При малоугловом рентгеновском рассеянии и светорассеянии этот вклад учесть крайне трудно. В случае же рассеяния нейтронов вклад детергентной «шубы» можно вычлениить, используя смеси $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, плотность которых сравнима с плотностью детергента.

Детальное описание методов, основанных на рассеянии в растворах, можно найти в книге [9]. По сравнению с аналити-

ческим ультрацентрифугированием они имеют два недостатка: 1) концентрация белка должна быть примерно в 100 раз больше; 2) практически невозможно оценить степень гомогенности материала. Впрочем, проводя измерения при разных концентрациях растворенного вещества, удастся выявить наличие равновесных ассоциатов. Вообще говоря, основная цель экспериментов по малоугловому рассеянию состоит в изучении формы молекул (см. ниже).

Регистрируя изменение светорассеяния в суспензиях мембранных везикул, можно следить за реакциями ассоциации и диссоциации белков на поверхности мембраны [10].

2.2.4. Центрифугирование в градиенте сахарозы и гель-фильтрация

Вес частиц, состоящих из солюбилизированных детергентом мембранных белков, можно также оценить, подставив в преобразованное уравнение Сведберга значение коэффициента седиментации, измеренного методом зонального центрифугирования.

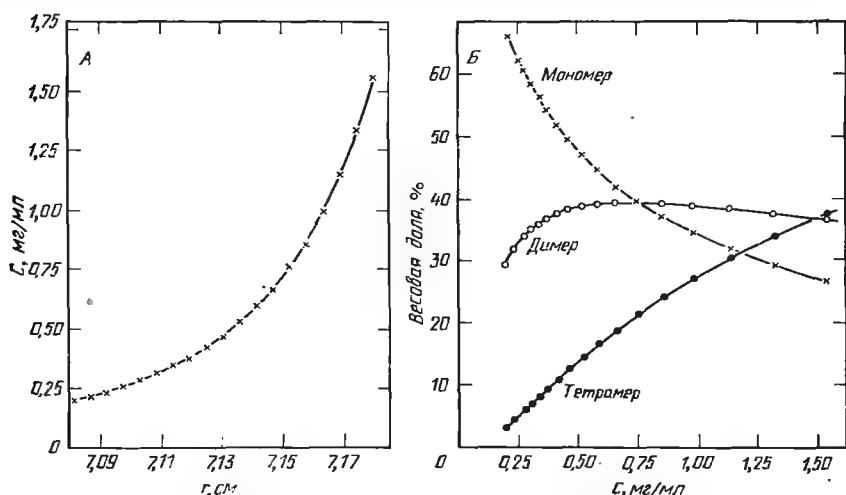


Рис. 8.1. Анализ седиментационного равновесия солюбилизированного в тритоне X-100 анионного переносчика (полоса 3) из мембран эритроцитов человека. Плотность растворителя была подобрана так, чтобы она была равна плотности детергента. А. Экспериментальная зависимость концентрации белка от радиуса (крестики) и теоретическая кривая (—), построенная по экспериментальным точкам методом наименьших квадратов с использованием модели самоассоциации мономер/димер/тетрамер. Б. Относительное содержание различных олигомерных форм в зависимости от локальной концентрации белка. Дополнительные данные указывают на существование в системе равновесия мономеры — олигомеры. (Из работы [8] с разрешения авторов.)

ния в градиенте плотности сахарозы (относительно стандартных водорастворимых белков), и значение кажущегося радиуса Стокса, измеренного с помощью гель-фильтрации [1]. Этот метод довольно прост и не требует наличия сложной аппаратуры или высокоочищенного материала. Необходимо, однако, отметить два существенных момента: во-первых, отсутствует теоретическое обоснование метода; во-вторых, на определяемые коэффициенты седиментации и радиусы Стокса неконтролируемым образом влияет связанный с белком детергент, а также гидратация белка [1]. Поэтому мы не рекомендуем применять этот метод к интегральным мембранным белкам.

2.2.5. Радиационная инактивация [см. также гл. 6]

Под действием ионизирующей радиации функциональная активность ферментов и рецепторов уменьшается. Теория мишени связывает зависимость потери активности от дозы с размерами мишеней, а следовательно, и с их молекулярной массой. Поскольку измеряемой величиной является биологическая активность, такой метод должен в принципе давать молекулярную массу некоей функциональной единицы, а не физического комплекса [11].

Согласно теории мишени, повреждение функциональных единиц целиком обусловлено первичной ионизацией. Поскольку в водных растворах возможны вторичные эффекты, опыты по радиационной инактивации обычно проводят на сухих, а еще лучше — на замороженных образцах. При этом нет необходимости очищать белок, поэтому исследовать можно и мембрано-связанные ферменты, и рецепторы в их естественном окружении.

Такой подход весьма информативен, но его применение сопряжено с рядом серьезных проблем, например с переносом энергии ([11, 12]; см. также гл. 6). Его лучше всего использовать в сочетании с другими методами.

2.3. Размеры молекул

Для получения детальных и достоверных данных о форме белков и их комплексов применяют два метода: дифракцию рентгеновских лучей на трехмерных кристаллах и реконструкцию трехмерного изображения по серии электронных микрофотографий двумерных кристаллов белка при разных углах наклона образца (см. разд. 2.4). В зависимости от разрешения с помощью этих методов можно получить подробную картину укладки полипептидной спирали в пространстве. Однако для большинства мембранных белков пока не удается получить со-

вершенных кристаллов, поэтому приходится применять менее чувствительные методы. Наиболее популярные из них — малоугловое рассеяние (особенно рассеяние нейтронов) и обычная электронная микроскопия.

2.3.1. Малоугловое рассеяние

Данные по малоугловому рассеянию рентгеновских лучей или нейтронов гомогенными макромолекулами или их комплексами позволяют оценить не только их молекулярную массу (разд. 2.2.3), но и весьма ценный параметр, характеризующий общий размер, а именно — радиус инерции R . Радиус инерции R в данном случае — это среднеквадратичное расстояние между центрами рассеяния и центром тяжести молекулы с учетом плотности рассеяния. Определяемое таким образом значение R увеличивается с увеличением анизотропии частиц и объема полости внутри частицы, а следовательно, может служить мерой их компактности. Если известна, скажем, общая форма частиц, то зная R , можно оценить их размер [13].

Дополнительную информацию о форме частиц дает анализ кривой рассеяния в широком интервале углов. К сожалению, готового соотношения, связывающего форму кривой и форму частицы в общем или в каком-либо конкретном случае, не существует. Поэтому обычно сравнивают полученную экспериментальную кривую рассеяния с теоретическими кривыми, рассчитанными сначала для простых тел (со случайной ориентацией). По достижении некоторого соответствия уточняют модель, рассмотрев более сложные варианты. Поскольку близкие кривые рассеяния можно получить для совершенно разных моделей, выбор наиболее подходящей модели требует дополнительных данных, например электронно-микроскопических. Несмотря на все эти сложности, во многих случаях такой подход оказался весьма успешным [13].

Вообще говоря, на кривые рассеяния влияет связанный с белком детергент (разд. 2.2.3). В случае нейтронного рассеяния это влияние можно устранить, используя подходящие смеси $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. В отсутствие детергентов возможности обоих методов — малоуглового рентгеновского рассеяния и рассеяния нейтронов — довольно близки.

Методы малоуглового рассеяния можно применять также для исследования интактных и реконструированных мембранных систем, предпочтительно находящихся в виде «стопок» [14, 15]. При этом получают цилиндрически усредненное относительно нормали к плоскости мембраны (а также усредненное по времени) распределение молекул белков и липидов. Однако чаще подобные системы исследуют методом рассеяния нейтронов,

особенно в сочетании с изоморфным замещением (например, дейтерированием) определенных мембранных компонентов. Максимальное пространственное разрешение составляет примерно 10 Å, а положение определенных меченых атомов в цилиндрически усредненной симметричной структуре можно определить с точностью 1 Å. Рис. 8.2 иллюстрирует применение методов рассеяния для исследования мембран саркоплазматического ретикулума. С помощью интенсивного синхротронного излучения или рентгеновских источников на лазерной плазме можно проследить за изменением структуры мембран во времени [15]. По-видимому, в будущем такой подход позволит значительно глубже проникнуть в природу структурно-функциональных связей в биологических мембранах.

2.3.2. Электронная микроскопия

Разрешающая способность электронного микроскопа лежит в диапазоне 20—40 Å, что соответствует средним линейным размерам белков с мол. массой около 20 000. Таким образом, этот метод позволяет грубо оценить размеры и форму большинства мембранных белков. К сожалению, в ходе приготовления препаратов форма белковых частиц может существенно измениться. Это относится как к негативному контрастированию, так и к напылению — стандартным способам окрашивания частиц [17]. И тем не менее электронная микроскопия — это основной метод, позволяющий судить о форме и размерах солиubilизированных мембранных белков, особенно если частицы имеют продолговатую форму. В качестве убедительного примера можно привести изучение спектрина — основного компонента цитоскелета мембран эритроцитов — и его взаимодействия с анкеринами [18]. Методом оттенения изолированных белковых частиц, напыляя металл под малым углом на вращающийся образец, удалось оценить размеры белка, установить конфигурацию спектринового гетеродимера и проиллюстрировать его гибкость, а также определить упаковку димеров в тетрамере спектрина и локализацию центров связывания анкерина (рис. 8.3).

2.3.3. Гидродинамические методы

Зная коэффициент трения частицы солиubilизированного белка и его молекулярную массу, можно определить так называемый формфактор, или число Перрена F , для белковой глобулы; это число равно отношению коэффициента трения частицы к коэффициенту трения сферы равного объема. Значение F несложно вычислить для эллипсоидов с разным отношением

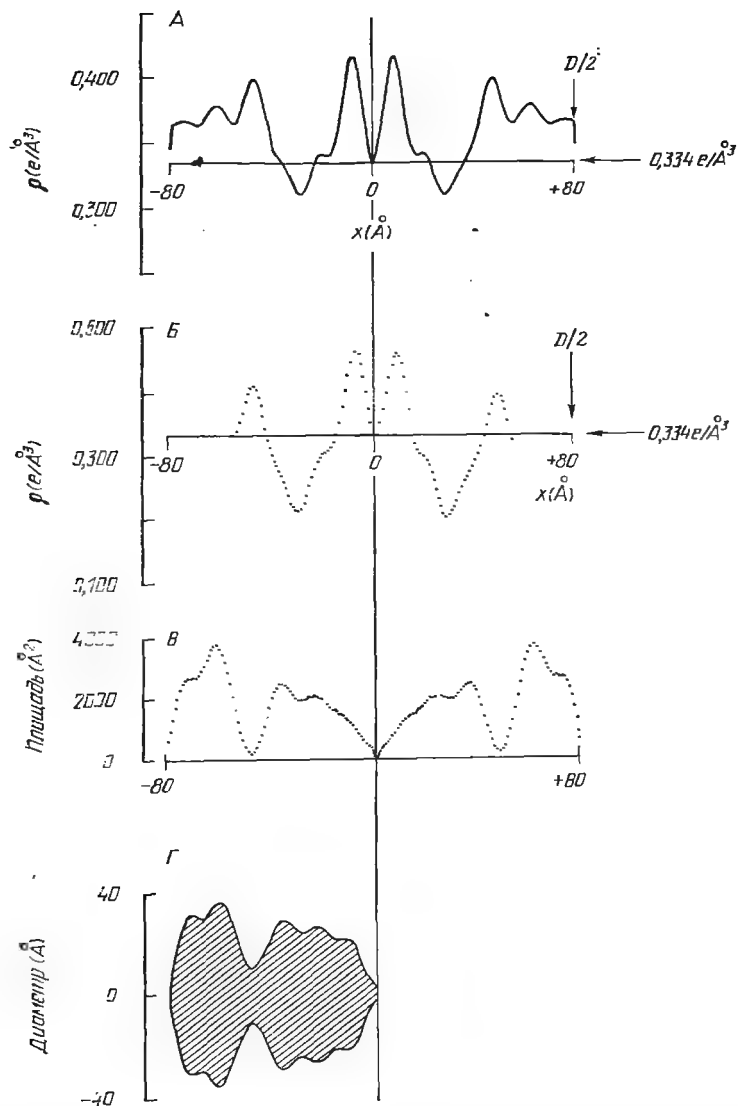


Рис. 8.2. Профиль электронной плотности мембраны саркоплазматического ретикулума (СР) с разрешением 10 $\text{\AA}$, полученный путем совместного использования методов рентгеновской и нейтронной дифракции. А. Профиль электронной плотности (абсолютная шкала) единичного элемента ориентированного мембранного мультислоя СР, образованного двумя противоположным образом направленными профилями слоев, принадлежащих двум уплощенным однослойным везикулам СР; профиль единичной мембраны заключен в интервале $0 \text{ \AA} < |x| < 80 \text{ \AA}$. Б. Профиль электронной плотности асимметричного липидного бислоя. В. Профиль отдельной белковой глобулы, представленный в виде площади в плоскости мембраны, занятой белком. Расположение белка в бислое можно также представить в виде профиля диаметра белковой глобулы (Γ). Для мембран СР получаемая картина соответствует структуре, цилиндрически усредненной относительно нормали к плоскости мембраны. (Из работы [16] с разрешения авторов.)

длин осей [9, 19], а сравнивая экспериментально определенную величину F с теоретической, можно оценить относительные размеры «эквивалентного» эллипсоида, а значит, и общую форму частицы. Коэффициент трения в свою очередь определяют либо из коэффициента диффузии (его измеряют с помощью аналитического ультрацентрифугирования или лучше неупругого светорассеяния), либо из коэффициента седиментации частиц (измеряемого аналитическим ультрацентрифугированием) [9, 19]. Зная вязкость, можно оценить параметр, близкий к F (коэффициент Симхи ν) [9, 19]. Техника эксперимента относительно проста, поэтому определение F или ν вполне оправданно, особенно если больше ничего неизвестно о форме частицы. В случае интегральных мембранных белков, однако, возникают серьезные проблемы, связанные с учетом вклада связанного с белком детергента; этот вклад может оказаться весьма значительным.

2.4. Конформация полипептидной цепи

2.4.1. Рентгеновская дифракция на трехмерных кристаллах

Рентгеноструктурный анализ единичных кристаллов белков — это классический метод определения их трехмерной структуры. Целью такого анализа является построение трехмерной карты электронной плотности. Количество получаемой при этом информации определяется разрешением карты, которое в свою очередь зависит от качества кристаллов белка и объема собранных и используемых данных. При разрешении 6—7 Å можно определить детальную форму белковой глобулы, субъединичную организацию, наличие спиральных участков; можно различить также некоторые характерные структурные особенности, например щели и полости. При разрешении 4 Å удастся выявить элементы вторичной структуры, природу, длину и направление связей. Карты электронной плотности с разрешением лучше 2 Å позволяют определить положение индивидуальных аминокислотных остатков полипептидной цепи. Детальное описание этих методов можно найти в книгах [9, 20].

Исследование с помощью рентгеноструктурного анализа интегральных мембранных белков долгое время было невозможно, поскольку не удавалось получить хорошие трехмерные кристаллы таких белков (см. работу [21] и гл. 5). Лишь недавно были выращены кристаллы порина из *Escherichia coli* [22] и фотосинтетического реакционного центра одного из видов пурпурных бактерий [21], причем в последнем случае была установлена полная трехмерная структура с разрешением 3 Å [23].

Определение детальной структуры мембранных белков ме-

тодом рентгеновской дифракции — крайне трудоемкая процедура, поэтому и число белков, которые удастся исследовать этим методом, вероятно, будет очень небольшим. В то же время рентгеноструктурный анализ — это единственный метод, позволяющий получить детальную информацию о структурных особенностях мембранных белков и их структурно-функциональных связях.

Недавние успехи в области нейтронной кристаллографии позволяют в дополнение к рентгеноструктурному анализу с высоким разрешением проводить измерения дифракции нейтронов на кристаллах мембранных белков. Методы нейтронной и рентгеновской дифракции очень сходны как по экспериментальной методологии, так и по получаемой структурной информации. Однако карты нейтронной плотности в отличие от карт электронной плотности содержат информацию о положении атомов водорода (или дейтерия). Поэтому эти два метода могут дополнять друг друга [24].

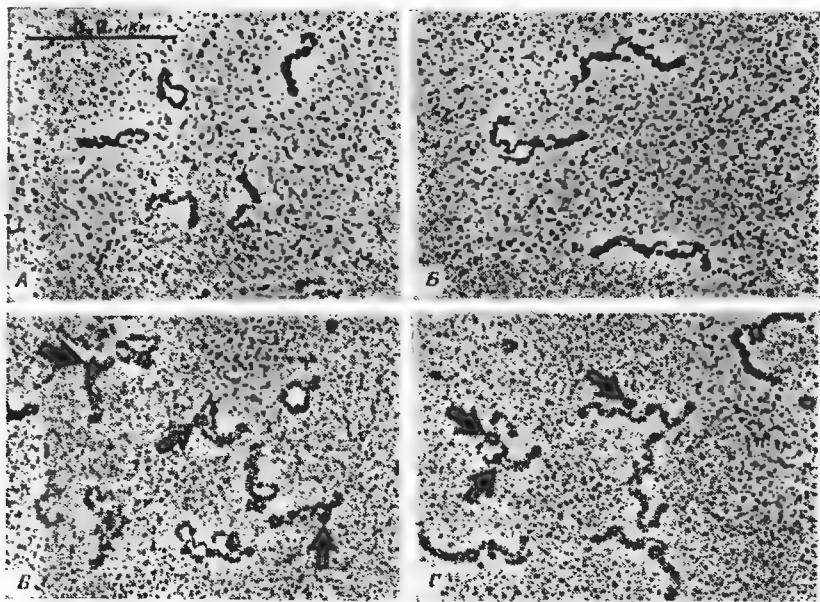


Рис. 8.3. Электронные микрофотографии оттененных образцов спектрина и спектрина/анкерина из мембран эритроцитов человека. А. Димеры спектрина. Б. Тетрамеры спектрина. В. Ассоциаты димеров спектрина с анкеринном. Г. Ассоциаты тетрамеров спектрина с анкеринном. Стрелками показано положение анкерина. (Из работы [18] с разрешения авторов.)

2.4.2. Электронно-микроскопический анализ двумерных кристаллов

Некоторые мембранные белки в нативных условиях формируют двумерную кристаллическую решетку. В ряде случаев образование такой решетки можно индуцировать либо в самой мембране, либо после ветраивания белка в липидный бислой. Электронная микроскопия такого двумерного кристалла при разных углах наклона плоскости кристалла в сочетании с анализом дифракции электронов позволяет определять трехмерную молекулярную структуру белка (описание метода см. в работах [20, 25, 26]). В отличие от обычной электронной микроскопии образцы в данном случае не нужно окрашивать, чтобы не маскировать внутренние структуры. В некоторых случаях, однако, важные структурные особенности, например трансмембранные каналы, можно выявить при параллельном исследовании окрашенных образцов [25]. Предельная разрешающая способность этого метода в настоящее время составляет, по-видимому, около 6 Å (т. е. заметно ниже, чем для рентгеновской кристаллографии трехмерных кристаллов).

Замечательный пример использования этого метода — пионерская работа Хендерсона и Ануина по изучению бактериородопсина [27]. Этот ретинальсодержащий белок (мол. масса 26 000) играет роль светозависимого протонного насоса в пурпурной мембране бактерии *Halobacterium halobium* и образует довольно обширные кристаллические блестяшки, состоящие примерно из 10 000 гексагонально упакованных молекул. Авторы получили 15 картин электронной дифракции и 18 электронных микрофотографий пурпурной мембраны при различных наклонах образца, по которым была восстановлена трехмерная контурная карта электронной плотности. Достигнутое разрешение составило 7 Å в плоскости мембраны и 14 Å в трансмембранном направлении. Из полученных данных следовало, что белок состоит из семи палочковидных полипептидных сегментов, по-видимому, α -спиральных участков, пересекающих мембрану (рис. 8.4). Следует отметить, что с помощью такого подхода пока не удалось выяснить структуру участков, соединяющих α -спирали, последовательность соединения α -спиралей, расположение боковых групп аминокислотных остатков и положение ретиналя.

2.4.3. Другие методы

Конформацию мембранных белков можно также изучать с помощью кругового дихроизма (КД) и дисперсии оптического вращения (ДОВ), а также двух других оптических методов — инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного



Рис. 8.4. Построенная на основе электронно-микроскопических данных трехмерная модель структуры бактериородопсина. Изображены сечения, параллельные плоскости мембраны. Верх и низ модели соответствуют участкам молекулы, контактирующим с водной фазой; остальная часть белка заключена в липидную фазу. Видно семь α -спиральных «палочек», на долю которых приходится примерно 75% длины всего полипептида. Три из них (на заднем плане) почти перпендикулярны плоскости мембраны, а другие немного наклонены. Общие размеры белка $25 \times 35 \times 45$ Å. (Из работы [27] с разрешения авторов.)

рассеяния. Вообще говоря, эти методы дают общую, а не детальную структурную информацию. В то же время они имеют ряд преимуществ: не требуют кристаллизации белка и могут применяться для исследования мембранных суспензий и белков в растворе. Кроме того, спектральные измерения относительно быстры и просты. С помощью этих методов можно 1) определять содержание различных элементов вторичной структуры — α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных участков; 2) изучать конформационные переходы.

1. *Круговой дихроизм.* Под круговым дихроизмом (КД) понимают явление, состоящее в разном поглощении света с правой и левой круговой поляризацией [28]. Метод ДОВ основан на различии соответствующих коэффициентов преломления. Оба метода очень чувствительны к изменениям вторичной структуры белков. В большинстве случаев лучше использовать КД, чем ДОВ. Подробно применение этих методов к исследованию мембран описано в книге [29].

Для определения содержания структур различных типов (α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных участков) измеряют спектр КД в диапазоне 185—240 нм. Затем методом наименьших квадратов подбирают такую линейную комбинацию трех базисных функций, описывающих спектры КД различных типов вторичных структур, которая лучше всего соответствовала бы экспериментально наблюдаемому спектру. Такая процедура прямо дает долю структур разного типа в исследуемом полипептиде. Интерпретация данных довольно однозначна, однако при исследовании белков, встроенных в бислой и/или образующих агрегаты [29], возникает целый ряд проблем. Так, по одним данным [29] в бактериородопсине содержится семь α -спиральных «палочек», а по другим [30] — только пять, а остальная часть молекулы находится в виде β -слоев [30]. Как нам кажется, подобные оценки содержания различных структурных элементов в мембранных белках имеет смысл рассматривать лишь как полуколичественные.

Несколько слов об исследовании конформационных изменений с помощью КД. Ясно, что структурные изменения белков сопровождаются спектральными изменениями. При интерпретации этих изменений и попытках связать их с перестройками вторичной структуры возникают те же трудности, что и при оценке содержания α -спиралей и β -слоев.

2. *Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния.* Эти методы основаны на измерении колебательных спектров белков. Основные измеряемые параметры — это положение и интенсивность так называемых полос амид I и амид III (см. обзоры [31, 32]). С помощью этих методов можно точно оценить содержание β -складчатых структур. Различить

α -спирали и неупорядоченные структуры по инфракрасным спектрам довольно трудно; более предпочтительными в этом отношении являются спектры комбинационного рассеяния.

Долгое время ИК-спектроскопию практически не применяли для исследования водных суспензий или растворов мембран и мембранных белков из-за сильного поглощения воды. Возможности метода были расширены в последнее время в связи с применением в ИК-спектроскопии фурье-анализа [31]. Комбинационное рассеяние света молекулами воды мало и не мешает анализу.

Отметим, что концентрация белка, необходимая для измерения ИК- или рамановских спектров водных растворов, составляет около 10 мг/мл, что на два порядка выше, чем при измерении КД.

2.5. Подвижность участков белковой молекулы

За последние годы был достигнут значительный прогресс в изучении внутренней подвижности водорастворимых белков [33]. Для изучения гибкости и подвижности частей полипептидного остова, а также подвижности аминокислотных остатков в кристаллах белков исследовали влияние температуры на распределение электронной плотности, получаемое методом рентгеновской дифракции. С помощью ЭПР высокого разрешения исследовали вращение аминокислотных остатков белков в водном растворе [33]. Измерение в наносекундном диапазоне кинетики уменьшения анизотропии флуоресценции позволило оценить скорость вращательной диффузии остатков триптофана [34]. Для исследования мембранных белков эти методы начали применять лишь недавно. В то же время изучение бактериородопсина с помощью ^2H -ЯМР показало большую ценность систематических исследований динамики мембранных белков. В этой работе в молекулы бактериородопсина вводили путем биосинтеза дейтерированные аминокислоты. Узкие пики ^2H -ЯМР-спектров, свидетельствующие о высокой подвижности меченых групп, отвечали остаткам, локализованным на поверхности белковой глобулы, а широкие линии, свидетельствующие об ограниченном движении, — остаткам, спрятанным внутри ее. Установленное таким образом положение различных меченых остатков неплохо согласуется с данными, полученными другими методами [35].

3. Структура липидов в составе биологических мембран и модельных систем

В биофизических исследованиях липидного компонента биологических мембран очень важную роль играют модельные системы, состоящие только из липидов. Это связано с тремя причинами.

1. Пригодные для физических исследований чистые и хорошо охарактеризованные образцы значительно легче получить искусственным путем из липидов (выделенных или синтезированных), чем из мембранных белков.

2. Чистые липиды спонтанно формируют протяженные структуры, сходные с липидными структурами в биологических мембранах, что позволяет, основываясь на результатах исследования таких систем, делать выводы о строении природных мембран.

3. Результаты структурных исследований изолированных липидов легче интерпретировать, чем данные, полученные на природных мембранах; следовательно, изучение искусственных систем может способствовать определению структуры липидов природных биембран и пониманию их функциональных свойств.

3.1. Обнаружение фазовых переходов

Липиды могут находиться в разных фазовых состояниях [36, 37]. Обычно первый шаг в изучении подобных систем состоит в построении фазовых диаграмм, т. е. зависимости температуры фазовых переходов от концентрации компонентов, и выявлении на диаграмме областей, соответствующих различным фазовым состояниям. Для регистрации температурных фазовых переходов используют несколько методов [37].

3.1.1. Калориметрия

Большинство температурных фазовых переходов можно регистрировать калориметрически. Современные методы — дифференциальный термический анализ (ДТА) и особенно дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) — значительно облегчили проведение подобных измерений и в то же время увеличили чувствительность. Сейчас калориметрия чаще всего используется для регистрации фазовых переходов или для изучения влияния на них внутренних и внешних параметров (например, длины жирнокислотного «хвоста», содержания холестерина, ионной силы, концентрации Ca^{2+} и т. д.). На рис. 8.5 приведен классический пример влияния длины жирнокислотного «хвоста» липидной молекулы на температуру двух фазовых переходов, определяемую методом ДСК. Следует отметить, что в липидных смесях с сильно гетерогенным составом жирных кислот или высоким содержанием холестерина фазовые переходы уширяются, что затрудняет их калориметрическую регистрацию [37—39].

3.1.2. Рентгеновское и нейтронное рассеяние

Эти методы позволяют надежно регистрировать фазовые переходы, поскольку картина рассеяния в значительной степени зависит от конфигурации полярной головки и жирнокислотного хвоста. Однако они больше подходят для детального исследования конфигурации липидов, чем для простой регистрации фазовых переходов (см. ниже).

3.1.3. Другие методы

Фазовые переходы в липидных системах можно изучать с помощью большинства спектроскопических методов. ^{31}P -ЯМР позволяет наблюдать за изменениями конфигурации гидрофильных головок фосфолипидов, а ^2H -ЯМР липидов с дейтерирован-

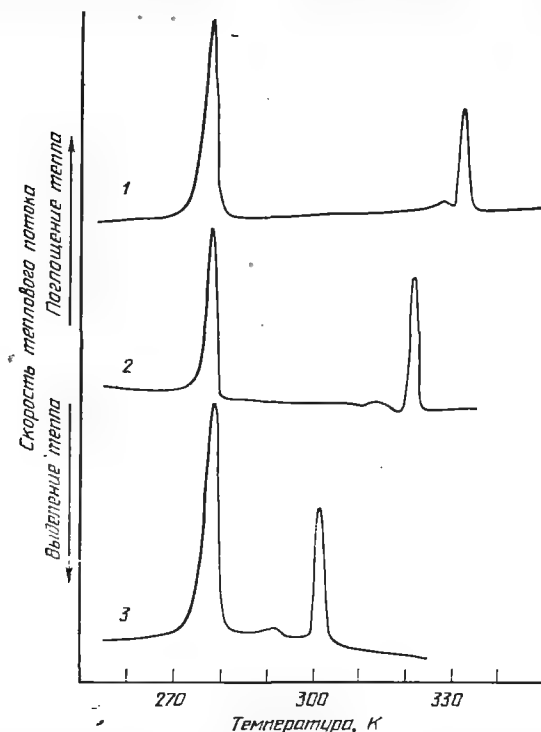


Рис. 8.5. Полученные методом ДСК кривые плавления дистеароил-, дипальмитоил- и димиристоилфосфатидилхолинов в воде (кривые 1, 2 и 3 соответственно); концентрация липидов равна 50% (в/в). Пики на термограммах соответствуют точке плавления льда (левый), так называемому предпереходу ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) (маленький пик) и точке плавления жирнокислотных цепей ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) липида. (Из работы [38] с разрешения авторов.)

ными головками или хвостами — за структурными изменениями как полярных, так и неполярных областей бислоя. Аналогичную информацию можно получить с помощью ЭПР или спектрофлуорометрии, если предварительно ввести в липиды жирные кислоты, содержащие спиновые или флуоресцентные метки (свободные или ковалентно связанные с фосфолипидами). В последнем случае можно использовать небольшие жирорастворимые молекулы, например 8-амин-1-нафталинсульфонат (АНС), флуоресценция которых зависит от фазового состояния системы. Фазовые состояния липидных систем можно изучать также с помощью ИК- и КР-спектроскопии, регистрируя изменения частоты колебаний связей C—H (или C—²H) в жирных кислотах [37].

3.2. Структура фаз

3.2.1. Дифракция рентгеновских лучей и нейтронов

Безводные или содержащие небольшое количество воды гомогенные липидные системы могут образовывать трехмерные кристаллы. Иногда такие кристаллы удается изучать методами рентгеновской или нейтронной дифракции. Это позволяет установить трехмерную структуру липидов на атомном уровне. Часто характерные особенности такой структуры бывают присущи и менее упорядоченным фазовым состояниям, что очень важно, если иметь в виду реальные биологические системы. Подобные фазовые состояния имеют преимущественно ламеллярную структуру, и их можно изучать методами рентгеновского или нейтронного рассеяния подобно тому, как это описано для белков в разд. 2.3. Поскольку углеводородные цепи образуют структуру, характеризующуюся наличием ближнего порядка, рассеяние наблюдается не только на малые, но и на большие углы. Применительно к липидам эти методы оказываются гораздо более информативными, чем применительно к белкам, особенно в случае плотно упакованных ламеллярных систем. С их помощью можно получить следующие характеристики:

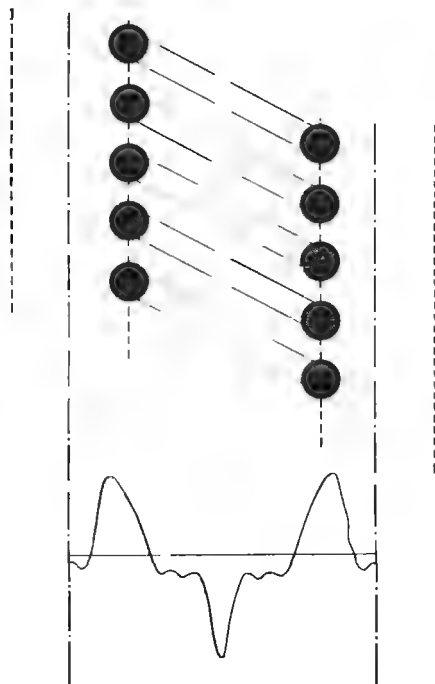
- 1) фазовые состояния липидных систем (общее расположение липидных молекул);
- 2) размеры бислоя;
- 3) углы наклона жирнокислотных цепей относительно плоскости бислоя;
- 4) среднюю степень упорядоченности цепей;
- 5) площадь, приходящуюся на одну липидную молекулу;
- 6) положение молекул воды [14, 20, 36].

Основной недостаток ранних работ по рентгеновскому рассеянию (см., например, рис. 8.6) состоял в том, что не были

известны фазы структурных факторов, поэтому полученные модели можно было рассматривать лишь как приближения. В современной постановке эксперимента для определения фаз заменяют одно ядро ^1H в липидных молекулах на ^2H [40]. Вместо дейтерирования иногда даже просто гидратируют липид с помощью D_2O [40].

Более детальную информацию о конфигурации фосфолипидов можно получить, используя дейтерированные в разных положениях производные определенных липидов. В этом случае

Рис. 8.6. Распределение электронной плотности в бислое, состоящем из дипальмитоилфосфатидилхолина (внизу), и структурная модель фазы L_β (вверху), полученные с помощью рентгеновского рассеяния. Жирнокислотные цепи полностью вытянуты и расположены наклонно относительно нормали к поверхности ламеллы. (Из работы [36] с разрешения авторов.)



положения ядер дейтерия, цилиндрически усредненные относительно нормали к плоскости мембраны, можно оценить с точностью примерно 1 Å. В результате удастся получить среднюю конфигурацию фосфолипидных молекул с разрешением порядка длины сегмента, причем при желании можно выявить даже тонкие структурные детали, например ориентацию полярных головок относительно плоскости мембраны. Используя фосфолипиды, у которых дейтерированы по отдельности одна и вторая жирнокислотные цепи, удастся выявить различия в конфигурации цепей [40, 41]. На рис. 8.7 приведен пример использования

этого метода (ср. с представленными на рис. 8.6 более ранними данными, полученными методом малоуглового рентгеновского рассеяния на такой же липидной системе, находящейся в таком же фазовом состоянии). Ширина распределения метки зависит от ориентационной разупорядоченности и флуктуации углов между сегментами цепи [41] (см. ниже).

Рентгеновское и нейтронное рассеяния можно применять также для определения положения молекул стероида относительно центра бислоя в смешанных системах, содержащих фосфолипид и холестерол [14]. Впрочем, с помощью этих методов не удается с высокой точностью установить расположение этих двух типов молекул в плоскости мембраны.

Применение избирательного дейтерирования молекул фосфолипидов не ограничивается модельными мембранами; меченые

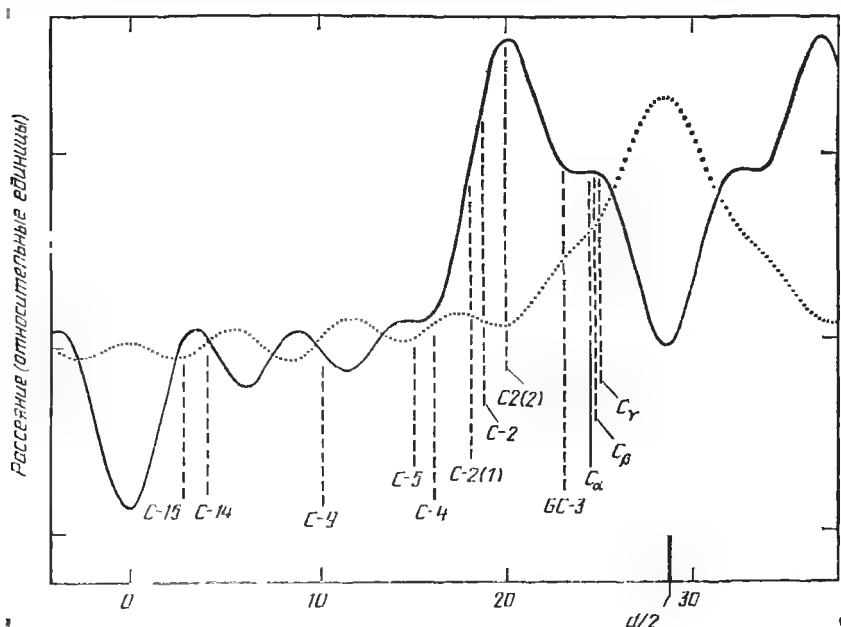


Рис. 8.7. Кривые плотности рассеяния нейтронов на бислой из недейтерированного дипальмитонфосфатидилхолина в фазе L_{β} (сплошная линия) и распределения молекул воды (пунктир). Средние положения меток в соответствующих дейтерированных липидах указаны вертикальными линиями. Расстояние измеряется от центра бислоя. Содержание воды в образце составляет 6% (в/в); измерения проводили при 20 °C. Отметим, что различные метки в полярной фосфохолиновой головке расположены очень близко друг к другу (в проекции), т. е. головки располагаются почти параллельно плоскости мембраны. Как видно из рисунка, вода проникает вплоть до глицеролового остова. (Из работы [40] с разрешения авторов.)

липиды можно ввести и в биологические мембраны. Следует, однако, отметить, что синтез дейтерированных фосфолипидов — довольно долгая процедура.

3.2.2. Ядерный магнитный резонанс

Метод ЯМР основан на измерении энергии радиочастотного электромагнитного излучения, поглощаемой при переходах ядер из одного спинового состояния в другое при наложении сильного магнитного поля. ЯМР — один из наиболее мощных методов исследования мембран: он позволяет наблюдать за отдельными ядрами и изучать их окружение и подвижность (общее представление о методе можно получить из книги [42]). В ранних работах для исследования биологических мембран и липидных систем применяли в основном ^1H -ЯМР. В последние годы, однако, более популярным становится магнитный резонанс на ядрах ^2H , ^{13}C и ^{31}P (подробности см. в работах [43, 44]).

1. *Определение статической упорядоченности методом ^2H -ЯМР.* Жирнокислотные «хвосты» фосфолипидных молекул, образующие «твердую» ламеллярную мезофазу (так называемое состояние геля), находятся в полностью упорядоченной конфигурации (полностью-транс). Выше температуры фазового перехода (в «жидком» бислое) может происходить быстрая транс-гош-изомеризация, приводящая к разупорядочению бислоя. Усредненная по времени ориентация данного сегмента цепи полностью описывается степенью локальной упорядоченности S_1 :

$$S_1 = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1), \quad (1)$$

где θ — мгновенный угол между направлением сегмента и нормалью к плоскости ламеллы, а черта означает усреднение по времени. Величина S_1 пропорциональна так называемому квадратуральному расщеплению сигналов ^2H -ЯМР, прямо определяемому из спектров дейтерированных липидов, встроенных в модельные системы или биологические мембраны [43].

2. *Выявление гексагональных фаз в липидах методом ^{31}P -ЯМР.* Спектры ^{31}P -ЯМР фосфолипидов, образующих небислойные и бислойные структуры, существенно отличаются друг от друга, и метод ^{31}P -ЯМР можно использовать в качестве чувствительного инструмента для выявления небислойных фаз или переходов бислоя — небислоя [45]. Это особенно важно в случае фосфатидилэтаноламина, который в физиологических условиях образует гексагональную мезофазу (H_{II}) и в то же время является основным компонентом липидных бислоев биологических мембран. Еще одним примером такого рода является поведение кардиолипина в присутствии Ca^{2+} [45]. Положение и форма

сигналов ^{31}P -ЯМР фосфатидилэтаноламина при температурном переходе от ламеллярной мезофазы к гексагональной существенно изменяются (рис. 8.8). Применение метода ^{31}P -ЯМР для изучения стабильности бислоев подробно рассмотрено в работе [47].

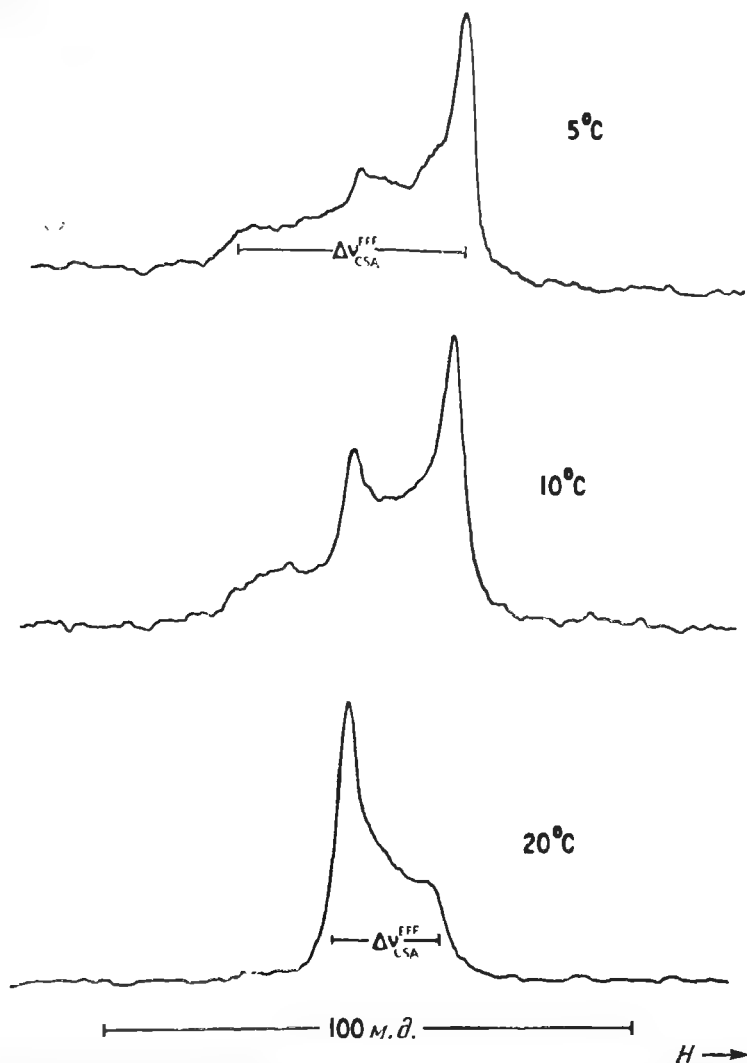


Рис. 8.8. Спектры ^{31}P -ЯМР водной суспензии диолеилфосфатидилэтаноламина при разных температурах. При 5°C липид находится в ламеллярной фазе (L_{α}), а при 20°C — в гексагональной (H_{II}). (Из работы [46] с разрешения авторов.)

3.2.3. Другие методы

Впервые параметры, характеризующие упорядоченность, были определены методом ЭПР спин-меченных жирных кислот (см. обзор [48]). Однако результаты измерения упорядоченности вдоль углеводородной цепи, полученные методами ЭПР и ^2H -ЯМР, отличаются друг от друга. По-видимому, в основном это различие обусловлено влиянием массивных спиновых меток [49], но отчасти оно может быть связано с различиями временных шкал этих методов [50].

Степень упорядоченности можно также оценить, измеряя кинетику деполяризации флуоресценции (или характерное время спада так называемой анизотропии флуоресценции) соответствующих молекул, либо «растворенных» в липидном бислое, либо ковалентно пришитых к молекулам липидов, после возбуждения флуоресценции импульсом поляризованного света [51, 52]. Показано, что существует однозначная связь между предельным значением степени анизотропии флуоресценции и степенью упорядоченности. Аналогичное соотношение наблюдается и тогда, когда вместо кинетики флуоресценции измеряется стационарная степень анизотропии флуоресценции при непрерывном освещении (определить ее значительно легче) [53, 54]. Как и в случае ^2H -ЯМР, для измерения степени упорядоченности вдоль всей углеводородной цепи необходимо иметь несколько производных данного липида, содержащих метки в разных участках цепи.

3.3. Разделение фаз и доменная структура

При фазовых переходах в смесях липидов в системе одновременно могут сосуществовать области с разной структурной организацией. Для обнаружения латерального фазового разделения и образующихся доменов можно использовать различные методы.

3.3.1. Дифракция рентгеновских лучей и нейтронов

Методы рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов используют не только для изучения организации липидов в одной фазе (разд. 3.2.1), но и для выявления неоднородности распределения липидов и латерального разделения фаз. Как и в других случаях, более информативным оказывается метод рассеяния нейтронов на дейтерированных липидах. Подробности применения этих методов для изучения смеси фосфатидилхолин — холестерол можно найти в работе [55].

3.3.2. ЭПР спин-меченных пептидов

Форма линий спектра ЭПР нитроксильных радикалов (наиболее часто используемая спиновая метка) определяется прежде всего спин-спиновым обменным взаимодействием, которое при высоких концентрациях этих радикалов может служить мерой взаимодействия между мечеными молекулами. Если концентрацию меток в «жидком» бислое подобрать так, чтобы при их равномерном распределении спин-спиновое взаимодействие было пренебрежимо мало, то любое сильное уширение линий будет свидетельствовать о фазовом разделении липидов и о концентрировании спин-меченных молекул в образовавшихся доменах. Рис. 8.9 иллюстрирует применение метода спиновых меток на

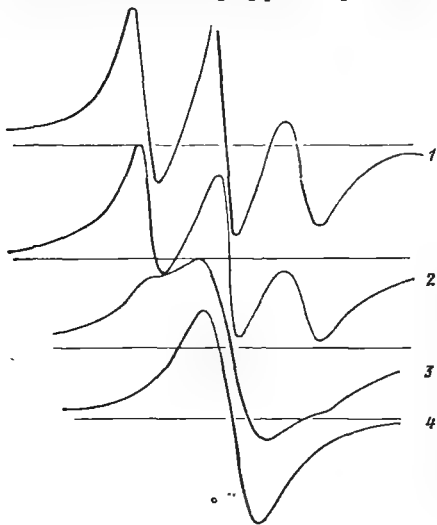


Рис. 8.9. Спектры ЭПР водных суспензий спин-меченного дипальмитоилфосфатидилхолина в отсутствие немеченого липида (4) и в присутствии немеченых дипальмитоилфосфатидной кислоты (3), дипальмитоилфосфатидилэтаноламина (2) и дипальмитоилфосфатидилхолина (1) при молярном отношении 2 : 8; pH=9, $T=59^{\circ}\text{C}$. Форма спектров 4 и 3 обусловлена уширением линий за счет спин-спинового взаимодействия. (Из работы [56] с разрешения авторов).

примере модельных мембран с высоким содержанием спин-меченных липидов. Используя такой подход, можно также оценить размеры доменов [56]. Однако распространить этот метод на биологические мембраны практически невозможно, поскольку при необходимых для измерений высоких концентрациях меток почти неизбежно происходит нарушение структуры мембраны.

3.3.3. Флуоресцентная спектроскопия

Об образовании в бислое «твердых» и «жидких» доменов можно судить по изменению квантового выхода флуоресценции некоторых красителей, например *транс*-паринаровой кислоты. Это вещество локализуется преимущественно в квазикристаллических «твердых» фазах фосфолипидов, и при этом наблюдается существенное увеличение интенсивности его флуоресценции

[57]. Другие вещества, например пирендеканоевая кислота, на-капливается в «жидкой» фазе; увеличение выхода флуоресценции в этом случае обусловлено образованием эксимеров [56]. Таким образом, в обеих системах образование соответствующих доменов при разделении фаз приводит к увеличению интенсивности флуоресценции.

С помощью флуоресцентной микроскопии можно следить за образованием флуоресцирующих и нефлуоресцирующих доменов в содержащих флуоресцентные красители липидных монослоях на границе воздух — вода; появление подобных доменов обусловлено латеральным разделением фаз при изменении температуры или давления [58].

3.3.4. Электронная микроскопия

С помощью электронной микроскопии образцов, полученных методом замораживания — скальвания, после напыления атомов тяжелых металлов можно исследовать морфологию внутренних поверхностей двух монослоев [59]. Одно из применений этой методики касается изучения модельных систем, содержащих фазу P_{β} , которая на микрофотографиях выглядит как регулярная «рябь» на поверхности мембраны [36]. В смешанных системах, содержащих эту фазу, гладкие и шероховатые участки, а также участки с другими морфологическими особенностями, могут существовать вместе [60]. Электронная микроскопия образцов, приготовленных методом замораживания — скальвания, позволяет определить, какие именно факторы влияют на распределение фаз в мембране. С помощью этой методики можно также обнаружить в модельных липидных системах или биомембранах домены с высоким содержанием стеролов. Для этого такие домены цитохимически окрашивают филипином или сапонином. Специфически связываясь с 3β -гидроксистеролами, эти вещества приводят к существенной деформации поверхности скола [61]. Аналогично домен с высоким содержанием отрицательно заряженных (кислых) липидов можно обнаружить, обработав мембрану полимиксином [61].

Латеральное разделение фаз в биомембранах может сопровождаться диссоциацией и, возможно, последующей агрегацией интегральных мембранных белков. На электронных микрофотографиях сколов мембран при этом наблюдаются четко выраженные скопления внутримембранных частиц.

3.4. Подвижность углеводородных «хвостов» липидных молекул

Подвижность сегментов углеводородных цепей фосфолипидов обуславливает «жидкое» состояние липидного бислоя. Молекулярная основа подвижности заключается в том, что связи

C—C жирнокислых «хвостов» могут находиться либо в *транс*-, либо в *гош*-конфигурации, а переход из одной конфигурации в другую происходит в результате поворота вокруг этих связей [62]. Возникающая при этом разупорядоченность характеризуется параметром S (разд. 3.2.2). Динамику *транс-гош*-изомеризации можно описать временем вращательной корреляции τ_k , т. е. временем, необходимым для поворота некой группы молекул на угол в 1 рад. Подвижность сегментов фосфолипидов влияет на многие их физические свойства и может изучаться соответствующими физическими методами. Однако количественная оценка параметров встречает затруднения по следующим причинам:

1) одновременно с *транс-гош*-изомеризацией липидные молекулы могут совершать и другие движения, влияющие на результаты измерений (например, возможно перемещение всей молекулы или только погруженной в бислой части);

2) подвижность сегментов носит анизотропный характер и ограничена в пространстве, поэтому часто не может адекватно описываться только величиной τ_k ;

3) полученные экспериментальные данные не удается прямо связать с параметрами, характеризующими физическое движение; приходится привлекать сложные и недостаточно обоснованные теории.

Все эти вопросы подробно рассмотрены в работах [43, 44, 50, 63].

3.4.1. ЯМР

При изучении сегментной подвижности фосфолипидов методом ЯМР измеряют либо время спин-решеточной релаксации T_1 , либо время спин-спиновой релаксации T_2 определенных ядер жирнокислотной цепи, либо полуширину соответствующих сигналов [44, 64]. Проще всего измерять T_1 .

Время T_1 спин-решеточной релаксации, называемое также временем продольной релаксации, — это время (для ансамбля идентичных ядер), необходимое для установления равновесного значения параллельной внешнему полю составляющей (Z -компоненты) магнитного момента после возмущения равновесия. T_1 можно точно измерить с помощью специальной импульсной техники [64]. Для этого используют как ^2H -, так и ^{13}C -ЯМР липидов, обогащенных этими изотопами. В простейших случаях T_1 обратно пропорционально τ_k , однако в общем случае связь между T_1 и τ_k гораздо сложнее [44, 64]. Пределы экспериментально определяемых T_1 соответствуют значениям τ_k от 10^{-4} до 10^{-11} с [65].

3.4.2. ЭПР спин-меченных фосфолипидов

Параметры спектров ЭПР нитроксильных спиновых меток зависят как от ориентации, так и от подвижности метки. Поэтому спектры нитроксильных радикалов, прочно связанных с разными сегментами углеводородной цепи фосфолипидной молекулы, содержат информацию о подвижности данного сегмента в модельных липидных системах или биомембранах. В принципе с помощью обычного ЭПР можно следить за процессами, протекающими с характерными временами $\tau_k = 10^{-7} - 10^{-11}$ с, а с помощью ЭПР с переносом насыщения $10^{-3} - 10^{-7}$ с [48, 66]. Сегменты с меньшими временами вращательной корреляции считаются иммобилизованными. К сожалению, расшифровка спектров ЭПР требует сложных вычислений [48, 66].

3.4.3. Деполяризация флуоресценции

Для определения микровязкости бислая η в непосредственной близости к метке можно использовать деполяризацию флуоресценции небольших жирорастворимых зондов, например перилена [56, 67]. Зная η , несложно вычислить время вращательной корреляции τ_k сегмента цепи, расположенного на глубине, соответствующей среднему положению зонда. И наоборот, определив методом ЭПР или ЯМР τ_k (как это описано в разд. 3.4.1 и 3.4.2), можно оценить вязкость η . Такой подход, связывающий подвижность липидов с вязкостью мембраны, которую в свою очередь можно определить по уменьшению анизотропии флуоресценции, довольно популярен. Однако имеется ряд осложняющих обстоятельств [43, 52, 67], которые, кстати, частично объясняют тот факт, что полученные разными методами значения вязкости мембраны различаются более чем на порядок [43].

4. Вращательная, латеральная и трансбислойная диффузия белков и липидов

Вращательная и латеральная диффузия компонентов «жидкого» бислая происходит с довольно большой скоростью. Отдельные молекулы могут также с определенной вероятностью перескакивать из одного монослоя в другой.

4.1. Вращательная диффузия белков

Как следует из оценок вязкости мембраны, полученных из флуоресцентных измерений и данных магнитного резонанса (разд. 3.4.3), нижняя оценка для времени вращательной корре-

ляции интегральных мембранных белков в липидном бислое составляет несколько микросекунд. С другой стороны, она может достигать нескольких секунд, если белок «заякорен» в мембране посредством белок-белковых взаимодействий. С помощью оптической спектроскопии триплетных зондов [68—72] или ЭПР с переносом насыщения [66, 68] можно измерить времена корреляции как в микросекундном, так и в миллисекундном диапазоне.

4.1.1. Оптическая спектроскопия триплетных зондов

Для измерения скоростей вращения в микро- и миллисекундном диапазонах методом оптической спектроскопии нужно, чтобы время жизни возбужденного состояния зонда было достаточно велико. Таким требованиям удовлетворяют триплетные состояния некоторых люминесцирующих органических молекул. Это могут быть как экзогенные зонды (например, производные эозина), ковалентно «пришитые» к белку, так и эндогенные лиганды (например, ретиналь в родопсине, бактериородопсине). В обоих случаях сначала после импульсного освещения линейно поляризованным светом получают популяцию ориентированных возбужденных молекул зонда. Такая ориентированная популяция обладает анизотропией:

- 1) поглощения в основном состоянии;
- 2) поглощения в триплетном состоянии;
- 3) испускания света из триплетного состояния (фосфоресценции);
- 4) испускания света из короткоживущего синглетного состояния (флуоресценции).

Вращение белковой молекулы с ковалентно пришитым к ней зондом приводит к уменьшению анизотропии как поглощаемого, так и испускаемого света. Поэтому, измеряя кинетику спада анизотропии, можно оценить скорость вращения.

И теоретически, и практически для измерения спада анизотропии можно использовать все четыре эффекта. Из применяющихся при этом физических методов наименьшей чувствительностью обладают методы, основанные на регистрации изменений поглощения [68]. Минимальная необходимая концентрация зонда равна приблизительно 1 мкМ [68]. Чувствительность методов, основанных на измерении фосфоресценции, примерно в 100 раз выше [71]. Но гораздо большей чувствительностью обладает недавно описанный метод «fluorescence depletion», основанный на эффекте (4). Сообщается, что он в 10^6 раз чувствительнее метода фосфоресценции, и с его помощью можно исследовать вращение мембранных белков на поверхности единичной клетки [71, 73]. Используя этот метод, удалось измерить кинетику

спада анизотропии при содержании менее 27 000 молекул анионного переносчика (полоса 3) на участке мембраны единичного эритроцита. Полученные результаты хорошо согласуются с данными других авторов [73].

Как и в случае вращения сегментов липидных молекул (разд. 3.4), при изучении вращательной диффузии мембранных белков основная сложность, по-видимому, состоит в интерпретации кинетических кривых деполяризации. Спад анизотропии сферической молекулы в изотропной среде описывается одноэкспоненциальной кривой; для корректного описания вращения эллипсоида нужны три экспоненты, а молекул неправильной формы — пять. Для описания кинетики деполяризации флуоресценции в анизотропной среде (например, в липидном бислое) или при наличии различных олигомерных форм белка приходится использовать еще более сложные уравнения. На практике попытки разложения полученной кинетической кривой более чем на две экспоненты обычно выходят за пределы точности эксперимента. Поэтому в большинстве случаев спад анизотропии описывают эмпирическими уравнениями, содержащими две экспоненты и некую константу [68, 69, 72]. Определяемые таким образом «времена вращательной корреляции» или аналогичные параметры характеризуют вращательные свойства белка лишь очень приближенно (см., например, работу [74]). Несмотря на это, спектроскопия триплетных состояний была и остается одним из основных методов качественного и полуколичественного анализа вращения белков в биомембранах.

4.1.2. ЭПР с переносом насыщения

При обычном ЭПР мощность микроволнового излучения стараются поддерживать на уровне значительно более низком, чем уровень мощности, при котором достигается насыщение наблюдаемого перехода. Метод ЭПР с переносом насыщения основан на противоположном принципе. В каждый момент времени при регистрации спектра ЭПР с насыщающим микроволновым излучением взаимодействуют только те молекулы, которые ориентированы определенным образом относительно направления приложенного магнитного поля. В результате вращательной диффузии ориентация этих спиновых меток меняется и они выходят из резонансного состояния, при этом другие молекулы переходят в него [66, 68, 75]. Таким образом, вращательная диффузия будет сильно влиять на форму спектра ЭПР. Этот эффект можно усилить, подобрав специальные условия модуляции и методы детектирования сигнала [66, 75].

На рис. 8.10 продемонстрированы возможности применения метода ЭПР с переносом насыщения для определения скоростей

молекулярного вращения. Исследовали свойства гемоглобина, содержащего жестко закрепленную спиновую метку, в растворителях с разной вязкостью, а значит, с разными временами вращательной корреляции (τ_k) белка. Амплитуды сигналов с различными g -факторами довольно резко, а иногда монотонно изменяются с изменением вязкости. В этом простом случае величину τ_k можно точно вычислить с помощью уравнения Дебая, а в качестве калибровочной кривой использовать зависимость параметров спектра от времени корреляции для изотропного вращения спиновой метки [76]. Однако в случае анизотропного вращения такая калибровка невозможна, поэтому для опреде-

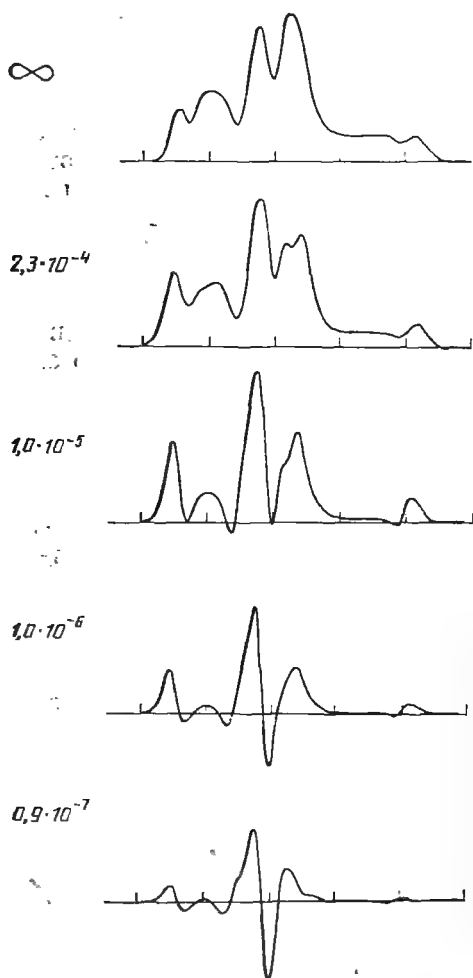


Рис. 8.10. Спектры ЭПР с переносом насыщения (вторая гармоника) для гемоглобина, содержащего ковалентно связанную спиновую метку — малеимиднитроксид — при разной ротационной подвижности белка. *Сверху вниз*: преципитированный Hb; Hb в 90%-ном глицероле при -12°C ; Hb в 80, 60 и 40%-ном глицероле при 5°C . Слева от спектров указано время вращательной корреляции (в секундах), вычисленное исходя из среднего диаметра белка и вязкости растворителя. (Из работы [76] с разрешения авторов.)

ления времен корреляции приходится прибегать к компьютерному моделированию спектров ЭПР. К сожалению, связь между спектральными параметрами и типом движения метки в анизотропной среде значительно менее очевидна и однозначна, чем для изотропного движения [66, 75]. Поэтому нам представляется, что изучение вращения белков в мембранах методом ЭПР с переносом насыщения пока может дать лишь качественные или в лучшем случае полуколичественные результаты.

4.2. Вращательная диффузия липидов

Подвижностью могут обладать не только отдельные участки углеводородной цепи фосфолипидной молекулы, но и молекула в целом. Так, она может вращаться вокруг продольной оси (вращение твердого тела), а сама эта ось может прецессировать относительно своего среднего положения [44, 50]. Описывать такие вращения для липидных систем в жидкокристаллическом состоянии можно по-разному. Некоторые авторы предпочитают использовать для этого вращательную изомерную модель, в которой движение твердого тела представляет собой суперпозицию движений его частей [43]. В других моделях, используя те же экспериментальные данные, движение твердого тела и изомеризацию цепи рассматривают как независимые и одновременные процессы. Поэтому для изучения вращательной диффузии липидов используют те же экспериментальные подходы, которые описаны в разд. 3.4.1 и 3.4.2.

При температурах ниже температуры основного фазового перехода фосфолипидных мембран *транс-гош*-изомеризация затруднена и, по-видимому, происходят в основном движения липидной молекулы как целого. Эти медленные движения лучше всего исследовать методом ЭПР с переносом насыщения с использованием спин-меченных липидов [77, 78]. Методические подходы и возникающие трудности здесь те же самые, что и при изучении вращения белков (разд. 4.1.2).

Молекула холестерина в биологических мембранах ведет себя практически как твердое тело (за исключением концевой сегмента алифатического «хвоста», обладающего способностью перемещаться относительно стероидного ядра [79]). В «жидком» липидном бислое (выше температуры фазового перехода) характерное время движения молекул холестерина лежит в том же диапазоне, что и для сегментов углеводородных цепей фосфолипидов, и для изучения подвижности холестерина применяются те же методы, что и для изучения подвижности сегментов фосфолипидных молекул: ^2H - и ^{13}C -ЯМР и обычный ЭПР (разд. 3.4.1 и 3.4.2). Для исследования «твердого» бислоя (состояние геля) можно использовать метод ЭПР с переносом на-

сыщения [78]. Как и для любых мембранных систем, интерпретация экспериментальных данных осложняется анизотропией движения.

4.3. Латеральная диффузия белков

Для исследования латеральной диффузии белков в биологических мембранах или искусственных бислоях используют практически один метод — восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (ВФФ). Существуют и варианты этого метода [например, флуоресцентный микрофотолиз (ФМ)].

Сначала белок ковалентно и — если это возможно — специфически метят флуоресцентной меткой, обычно производными флуоресцеина или родамина. За объектом (как правило, это единичная клетка) наблюдают с помощью флуоресцентного микроскопа. В наиболее широко используемом варианте метода часть или весь флуорофор на небольшом участке мембраны фотохимически разрушают (обесцвечивают) с помощью мощного импульса лазерного излучения. Типичный размер обесцвеченного пятна — около 10 мкм. Сразу после этого измеряют кинетику восстановления флуоресценции в облученном участке благодаря диффузии молекул белка из соседних областей мембраны. Для этого в обесцвеченном участке возбуждают флуоресценцию посредством сильно ослабленного лазерного пучка (достаточно слабого, чтобы не вызывать дальнейшего обесцвечивания), с помощью микроскопа «собирают» свет, испускаемый при флуоресценции, и передают его на фотоумножитель [68, 80, 81]. В разновидности метода, называемой «непрерывный флуоресцентный микрофотолиз» (НФМ), обесцвечивание и измерение диффузии производят одновременно, для чего интенсивность света поддерживают на постоянном промежуточном уровне [80—82].

Обработка результатов, полученных методом ВФФ, значительно более проста, чем методом НФМ. В большинстве случаев приходится применять процедуру подгонки, но иногда можно прямо использовать формулы. Для оценки скоростей латеральной диффузии методом НФМ необходимо одновременно учитывать и диффузию (или поток), и кинетику обесцвечивания, для чего требуется вводить дополнительные параметры. Поэтому данный метод лучше всего применять для изучения систем с простыми диффузионными свойствами. В то же время метод НФМ на несколько порядков чувствительнее, чем стандартный метод ВФФ [82]; с его помощью удастся оценить коэффициенты диффузии минорных мембранных белков, например гормонов или рецепторов вирусов.

Указанные методы позволяют определить характер транспортного процесса (диффузия или поток), коэффициент диффу-

зии D и/или скорость потока, а также долю подвижного флуорофора [83]. Диапазон значений D , которые можно измерить обоими методами, составляет от 10^{-6} до 10^{-12} см²/с [80, 81]. Частицы, для которых $D < 10^{-12}$ см²/с, обычно считаются неподвижными (иммобилизованными). У подвижных мембранных белков D достигает 10^{-8} см²/с.

Метод ВФФ позволяет не только оценить коэффициент диффузии, но и подойти к выявлению процессов, регулирующих подвижность мембранных белков. Рис. 8.11, например, иллюстрирует влияние состояния цитоскелета эритроцитов на кинетику восстановления флуоресценции и на размеры иммобилизованной фракции белка полосы 3 эритроцитарной мембраны. Другие примеры приведены в работе [80].

4.4. Латеральная диффузия липидов

В отличие от диффузии белков латеральную диффузию липидов изучают с помощью целого ряда экспериментальных подходов.

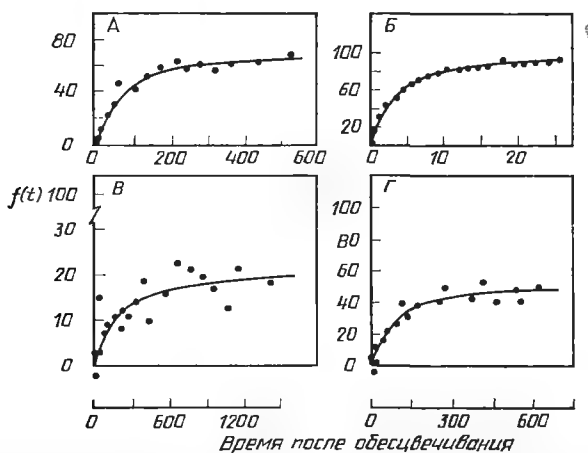


Рис. 8.11. Экспериментальные данные (точки) и соответствующие им теоретические кривые ВФФ окрашенных эозином теней эритроцитов при pH 7,4 и различных температурах и концентрациях солей. Эозин был связан исключительно с белком полосы 3. Параметр $f(t)$ — это степень восстановления флуоресценции (в процентах) в момент времени t относительно исходного уровня. А. 21 °С, 5 мМ фосфат натрия. Б. 37 °С, 13 мМ фосфат натрия. В. 21 °С, 46 мМ фосфат натрия. Г. 37 °С, 46 мМ фосфат натрия. Обратите внимание на значительные различия в характерных временах (т. е. в коэффициентах диффузии) и в размерах мобильной фракции белка. Условия проведения эксперимента влияют в основном на структуру цитоскелета эритроцитов, который в свою очередь регулирует латеральную диффузию белка полосы 3. (Из работы [84] с разрешения авторов).

4.4.1. Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания

Метод ВФФ с равным успехом применим и к содержащим ковалентно связанный флуорофор липидным молекулам; в настоящее время, вероятно, этот подход наиболее популярен. Диапазон коэффициентов диффузии для липидов составляет от 10^{-7} до 10^{-11} см²/с [80] и лучше соответствует возможностям ВФФ, чем в случае белков. Обычно для достижения достаточно высокого соотношения сигнал/шум эксперименты по фотообесцвечиванию проводят в условиях, при которых молярное отношение меченых и немеченых липидов составляет около 0,01; если применяют метод НФМ, доля меченых липидов может быть значительно ниже. Получаемая таким образом величина D представляет собой коэффициент диффузии меченых молекул липидов в окружении немеченых, а если структурно эти два типа молекул различаются слабо, можно надеяться, что это значение близко к коэффициенту самодиффузии немеченых липидов. Тем не менее приходится констатировать, что объемный флуорофор будет оказывать существенное возмущающее влияние на микроокружение зонда. Это может сказаться на вычисляемой величине D , особенно при низких подвижностях зонда в «твердом» бислое.

4.4.2. ЭПР спин-меченных липидов

Случайным образом диффундирующие в плоскости мембраны спин-меченные липиды сталкиваются друг с другом. При этом возникает спин-спиновое обменное взаимодействие, приводящее к уширению сигналов ЭПР (разд. 3.3.2). Поскольку частота столкновений прямо зависит не только от концентрации метки, но и от коэффициента диффузии D , зная ширину линий, можно определить D для спин-меченных молекул. Обычно для этого используют концентрации спиновых меток в пределах 0,1—0,4 от количества немеченых липидов. Коэффициент диффузии D и ширина линий связаны довольно простым соотношением, с помощью которого легко оценить D [66, 85, 86]. Следует отметить, что, как и для ВФФ, объемные спиновые метки непременно окажут влияние на организацию липидов в бислое, а следовательно, и на их диффузию.

4.4.3. ЯМР

Важное преимущество метода ЯМР перед всеми остальными рассмотренными в разд. 4.4 методами состоит в том, что ЯМР-метки никак не влияют на динамические свойства исследуемых липидов. Но здесь существуют свои проблемы.

Точное значение D можно прямо определить с помощью

импульсных ^1H -ЯМР-методов, в частности, методом спинного эха в градиенте магнитного поля. Однако этот способ применим лишь к макроскопически ориентированным липидным бислоям. Кроме того, для липидов в состоянии геля эта методика вообще непригодна [44, 87]. Таким образом, возможности ЯМР довольно сильно ограничены.

Коэффициенты латеральной диффузии липидов оценивали также из зависимости ширины линий спектра ^{31}P -ЯМР от вязкости растворителя [88]. При этом, правда, вычисления приходилось проводить при довольно сильных допущениях.

4.4.4. Другие методы

Новая методика исследования латеральной диффузии липидов в плоских мультислоях по постановке эксперимента напоминает ВФФ. Небольшой участок ампулы с содержащим спин-меченные липиды образцом освещают двумя последовательными импульсами света, вызывающими фотохимическую инактивацию меток. За время между вспышками спин-меченные липиды диффундируют из затемненной зоны в засвеченную. По уменьшению интенсивности сигнала ЭПР после второй вспышки света определяют коэффициент диффузии липидов [89]. Сообщалось, что этот метод обладает довольно широкими возможностями и применим для оценки подвижности липидов в широком интервале характерных времен.

Латеральную диффузию меченных флуорофором липидов можно изучать также с помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС). По постановке эксперимента этот метод в основном идентичен методу ВФФ, за исключением того, что в ФКС применяется не обесцвечивание образца, а индуцируемая лазером флуоресценция. При этом регистрируются спонтанные флуктуации концентрации метки на микроскопических участках поверхности. Коэффициент диффузии определяют с помощью анализа автокорреляционной функции флуктуаций [90]. Эта методика неприменима для изучения медленной диффузии (например, диффузии мембранных белков) и ограничивается исследованием систематических флуктуаций. Тем не менее корреляционная спектроскопия с успехом применяется для исследования черных липидных мембран или липидных мультислоев в жидко-кристаллическом состоянии и в состоянии геля [91].

4.5. Трансбислойная диффузия липидов

При трансмембранной диффузии, или «флип-флопе», компоненты мембраны переходят из одной половины липидного бислоя в другую. Такие «перескоки» совершают молекулы жирных кис-

лот, фосфолипидов и холестерина, а также некоторых ионофоров пептидной природы, например валиномицин, но не молекулы мембранных белков. Поэтому далее мы будем говорить только о мембранных липидах.

Исследование флип-флоп-переходов липидных молекул наталкивается на серьезную проблему, состоящую в том, что нужно уметь отличать «природные» переходы от тех, которые могут индуцироваться в результате манипуляций с мембранами в ходе эксперимента. Частота таких индуцированных переходов может значительно превышать частоту природных флип-флопов, причем, вероятно, их очень трудно предотвратить [92]. Вообще говоря, предполагается, что результаты опытов, в которых получены меньшие скорости трансмембранного перескока молекул липидов, ближе к истине, чем те, в которых для той же системы получены большие скорости. Флип-флоп-переходы можно изучать биохимическими методами (см. гл. 4 и работы [92—94]); из биофизических методов используют ЭПР и ЯМР.

4.5.1. ЭПР спин-меченных липидов

Обычно эксперимент состоит в том, что спин-меченные липиды вводят симметрично в мембраны замкнутых везикул или клеток, а затем делают распределение асимметричным. Для этого либо восстанавливают с помощью аскорбата метки, расположенные на наружной стороне мембраны (тем самым из спектра исключаются линии радикалов, связанных с липидами наружного монослоя мембраны) [95], либо разрушают метки на внутренней стороне с помощью эндогенных клеточных восстанавливающих агентов [96]. Характерное время флип-флоп-переходов определяют из кинетики последующих изменений зарегистрированного вначале ЭПР-сигнала [95, 96]. К сожалению, полученные таким способом результаты иногда оказываются весьма противоречивыми. Например, характерное время флип-флоп-переходов спин-меченных аналогов фосфатидилхолина в мембранах эритроцитов человека при одних и тех же температурах варьирует по данным разных авторов от нескольких минут [68] до более чем 4 ч [96]. Определенный вклад в эту вариабельность, вероятно, вносит нарушение конфигурации липидов некоторыми спиновыми метками или аскорбатом.

4.5.2. ЯМР

Исследование флип-флоп-переходов липидов методом ЯМР основано на регистрации сигналов ядер, принадлежащих полярным головкам, в присутствии не проникающих через мембрану «смещающих реагентов». Эти реагенты — в основном парамаг-

нитные катионы Dy^{3+} или Nd^{3+} — способны изменять напряженность резонансного магнитного поля и в то же время приводить к уширению сигнала тех ядер, с которыми они контактируют. Таким образом, добавление «смещающего реагента» к замкнутым фосфолипидным везикулам изменяет положение и форму ЯМР-сигналов полярных головок наружного монослоя мембраны и не влияет на соответствующие сигналы от внутреннего монослоя. Этот эффект широко применяют для изучения структуры мелких липидных везикул методом ^{31}P - или ^{13}C -ЯМР [97, 98]. ^{13}C -ЯМР используют также для исследования флип-флоп-переходов фосфолипидов. Для этого вносят асимметрию в распределение ядер ^{13}C в полярных головках липидов, вводя ^{13}C -фосфолипиды в наружный монослой с помощью белков фосфолипидного обмена (гл. 4). Трансбислойную диффузию ^{13}C -меченных липидов во внутренний монослой регистрируют, следя за интенсивностью сигнала ядер ^{13}C в отсутствие или в присутствии смещающих реагентов [99] (рис. 8.12). Как видно из ри-

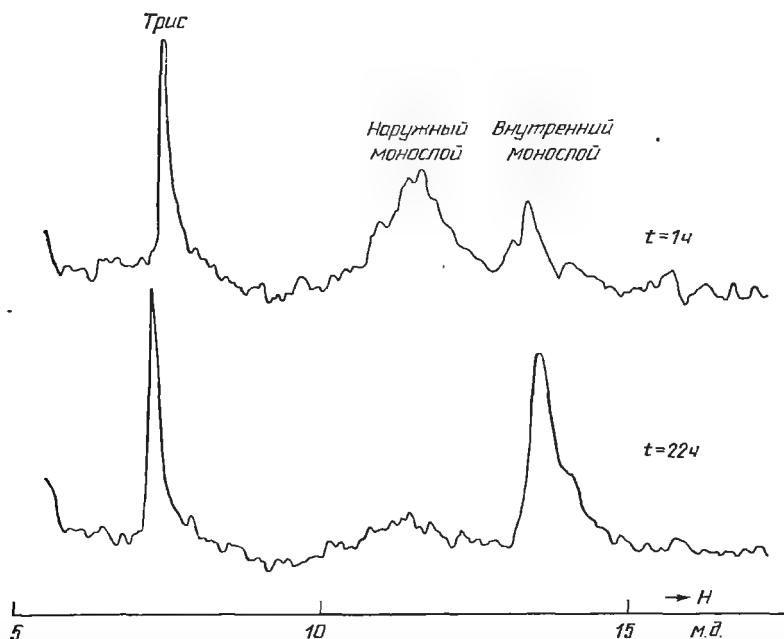


Рис. 8.12. Спектры ^{13}C -ЯМР диолеилфосфатидилхолина с меченой гидрофильной головкой в составе липосом из димристоилфосфатидилхолина. Спектры снимали через 1 ч и 22 ч после введения меченого липида в наружный монослой везикул с помощью белка фосфолипидного обмена. Перед регистрацией в среду добавляли раствор $DyCl_3$ (конечная концентрация 2 мМ). (Из работы [99] с разрешения авторов.)

сунка, относительно быстрые флип-флоп-переходы связаны с неравновесным распределением небольшого количества диолеилфосфатидилэтаноламина в димиристоилфосфатидилхолиновых везикулах и не наблюдаются в везикулах, состоящих только из одного фосфолипида [99].

Метод ЯМР неприменим к целым клеткам из-за недостаточного разрешения спектров.

5. Взаимодействия белок — липид

На первый взгляд липидный бислой, в который погружены интегральные мембранные белки, кажется достаточно инертным растворителем белковых глобул с гидрофобной поверхностью. Во многих случаях, однако, из-за разнообразия природы белково-липидных взаимодействий молекулы фосфолипидов, непосредственно контактирующие с белком, приобретают особые свойства (например, меньшую подвижность, измененную упорядоченность, избирательность в связывании липидов). Белок может влиять на конфигурацию и подвижность даже тех молекул липида, которые не находятся в контакте с ним. Белково-липидные взаимодействия могут приводить и к изменению конформации белка. В некоторых нетипичных случаях белок даже содержит несколько очень важных в функциональном отношении липидсвязывающих центров, характеризующихся высоким сродством к определенным липидам. Это могут быть как интегральные, так и периферические белки.

Более детальное описание рассмотренных ниже методов можно найти в обзоре [100].

5.1. Характеристика белково-липидного связывания

В этом разделе мы остановимся на методах выявления связанных с белком липидов и методах определения таких характеристик белково-липидных комплексов, как время жизни, стехиометрия и специфичность.

5.1.1. ЭПР

Впервые влияние мембранных белков на свойства липидного окружения удалось обнаружить методом ЭПР спин-меченных липидов [101]. Сейчас достоверно доказано, что спектры ЭПР природных или реконструированных мембран, содержащих в небольшом количестве спин-меченные липиды, можно представить в виде суммы двух спектров, отвечающих «иммобилизованным» и подвижным липидным молекулам, причем спектр последних практически не отличается от спектра бислоев, не содержащих

белка. Соответствующий пример приведен на рис. 8.13. Большинство авторов склонны считать, что «иммобилизованная» липидная фракция представляет собой наиболее глубокие, прилегающие к молекуле белка слои липидных молекул (так называемые аннулярные липиды) [66, 100, 101], а не молекулы фосфолипида, «зажатые» между агрегированными белками [102—105].

Важно отметить, что основываясь на результатах ЭПР-измерений, к классу «иммобилизованных» относят липидные молекулы или их участки, времена вращательной корреляции которых превышают примерно 10^{-7} с ([48, 66]; см. также разд. 3.4.2). Таким образом, «иммобилизованные» липиды все еще могут обладать значительной подвижностью, и в частности, могут обмениваться с другими липидными молекулами со скоростью до 10^7 с $^{-1}$ [43, 48, 66]. ЯМР-измерения показали, что такой обмен действительно происходит [43, 100]. Если молекулы липидов обмениваются быстрее, чем 10^7 раз в секунду (например, при повышении температуры), обусловленные аннулярными липидами сигналы ЭПР частично усредняются с сигналом от общего

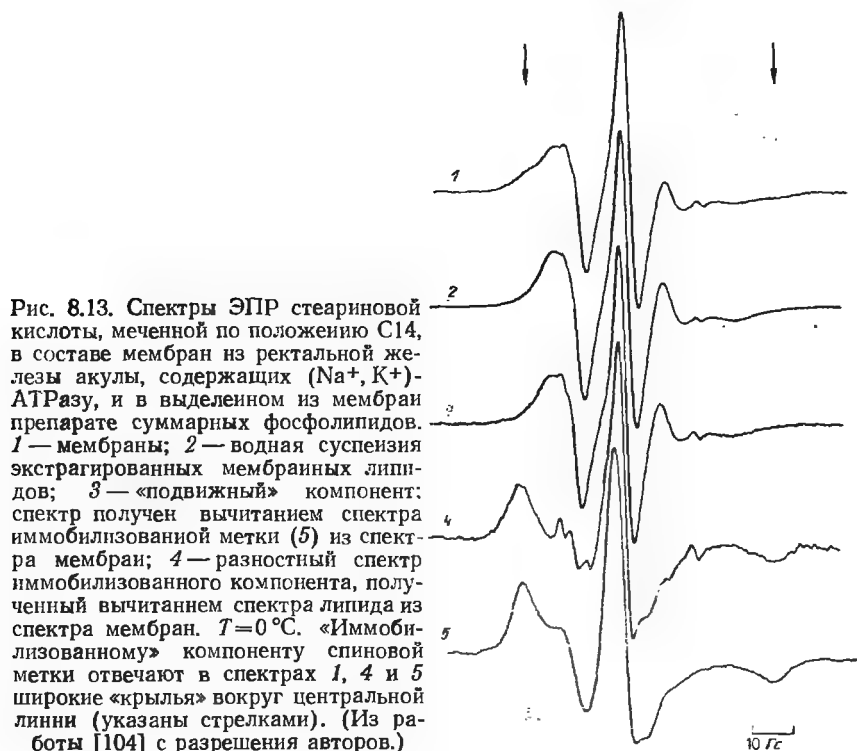


Рис. 8.13. Спектры ЭПР стеариновой кислоты, меченной по положению C14, в составе мембран из ректальной железы акулы, содержащих $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPазу}$, и в выделенном из мембран препарате суммарных фосфолипидов. 1 — мембраны; 2 — водная суспензия экстрагированных мембранных липидов; 3 — «подвижный» компонент; спектр получен вычитанием спектра иммобилизованной метки (5) из спектра мембран; 4 — разностный спектр иммобилизованного компонента, полученный вычитанием спектра липида из спектра мембран. $T=0^\circ\text{C}$. «Иммобилизованному» компоненту спиновой метки отвечают в спектрах 1, 4 и 5 широкие «крылья» вокруг центральной линии (указаны стрелками). (Из работы [104] с разрешения авторов.)

пула липидов. Это приводит к уменьшению вклада в спектр компонента с ограниченной подвижностью [100].

Предполагая, что ЭПР-сигнал «иммобилизованного» типа полностью связан с аннулярными липидами, можно оценить число фосфолипидных молекул, контактирующих с белком. В реконструированных белково-липидных системах эту оценку можно получить при различных соотношениях белок/липид, повысив тем самым надежность интерпретации измеряемых спектров. Кроме того, варьируя концентрацию спин-меченных липидов, можно определить относительное сродство различных видов меченых липидов к данному белку, а значит, оценить специфичность белково-липидных взаимодействий [100, 104]. Необходимо отметить, однако, что определяемое таким образом относительное сродство представляет собой усредненную величину. Поскольку число молекул аннулярных липидов на молекулу белка превышает для большинства систем 20—60 [66, 100, 101, 105], можно не выявить в белке одного или нескольких центров специфического связывания липидов с высоким сродством (см., например, работы [106, 107]).

Попытки определения размеров фракции мембранных липидов с ограниченной подвижностью наталкиваются на две серьезные трудности.

1. Использование различных методов разложения спектра ЭПР на две составляющие, соответствующие спектрам фракций липидов с ограниченной и неограниченной подвижностями, может давать совершенно разные результаты [100].

2. Независимо от метода оценки *кажущиеся* размеры фракций с ограниченной подвижностью зависят не только от температуры (см. выше), но и от положения спиновой метки в липидной молекуле. Кроме того, они могут зависеть от гибкости меченых молекул фосфолипида [100].

5.1.2. ЯМР

С помощью ЯМР можно изучать более медленные процессы, чем с помощью ЭПР; усреднение по ориентации ядерных спинов происходит за времена порядка 10^{-4} с, а в случае ЭПР эта величина составляет 10^{-7} с. Поскольку липидный обмен между аннулярным слоем и основным пулом липидов происходит быстрее, чем за 10^{-4} с, ЯМР-спектры не позволяют выявить наличие двух липидных субпопуляций с разной подвижностью, и получаемая картина соответствует единой липидной популяции с усредненными характеристиками. С другой стороны, благодаря способности регистрировать процессы с характерными временами менее миллисекунды ЯМР позволяет обнаруживать и исследовать субпопуляции, которые более прочно, а значит, и более специ-

фично связаны с мембранными белками липидов, чем со «средним» аннулярным липидом. Пока, однако, такая возможность используется недостаточно широко; по-видимому, это связано с трудностями получения больших количеств ^2H - или ^{13}C -меченных аналогов фосфолипидов, а также с недостаточной чувствительностью метода.

5.1.3. Измерение флуоресценции

Естественная флуоресценция остатков триптофана и ковалентно «пришитых» к белку меток может тушиться спин-мечеными или бромированными липидами [9, 108, 109]. Поскольку такое тушение происходит, лишь когда расстояние между флуоресцирующей группой и тушителем не превышает $\sim 7 \text{ \AA}$, тушителем могут быть прямо прилегающие к белку молекулы липида (т. е. часть аннулярных липидов). Время жизни возбужденного состояния и триптофана, и типичных экзогенных флуорофоров менее 10^{-7} с. Следовательно, обмен между аннулярным слоем и всем липидным пулом почти не будет влиять на тушение флуоресценции. Правда, это зависит от числа и положения флуоресцентных групп в молекуле белка, а также от локализации групп-тушителей на липидных молекулах. При изучении белково-липидных взаимодействий этим методом лучше всего, по-видимому, в смесях меченых и немеченых липидов определять эффективность тушения флуоресценции для нескольких фосфолипидов с разными полярными головками, но одинаковыми жирнокислотными цепями с ковалентно пришитыми к ним группами (группой)-тушителями. Это позволит сразу определить относительное сродство различных фосфолипидов к тем участкам белков, в которых локализованы флуоресцентные группы, а также число окружающих флуорофор молекул липида. Основное преимущество метода — высокая чувствительность, особенно когда используются экзогенные хромофоры с долгоживущим возбужденным состоянием [100, 108, 109].

Другой подход к исследованию белково-липидных взаимодействий заключается в регистрации разгорания (или в некоторых случаях уменьшения) флуоресценции белков из-за ассоциации их с липидами. Этот метод используется в основном для изучения периферических мембранных белков. Можно анализировать также связывание белка как с единичными молекулами липидов, так и с липидными моно- и бислоями (везикулами). Константы связывания и стехиометрию определяют из зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации белка [100, 110]. На рис. 8.14 приведен пример использования флуоресценции для изучения взаимодействия спектрина, основного белка цитоскелета мембраны эритроцитов, с липосомами из фосфатидилсерина.

Специфичность белково-липидных взаимодействий можно изучать также, измеряя эффективность синглет-синглетного переноса энергии [9]. В этом случае определяют увеличение интенсивности флуоресценции липида вследствие переноса энергии от остатков триптофана белка на ковалентно связанную с липидом молекулу соответствующего флуорофора либо, наоборот, тушение флуоресценции меченого липида из-за переноса энергии на связанный с белком хромофор (спектр поглощения которого перекрывается со спектром испускания флуорофора). Важная особенность данного подхода состоит в том, что синглет-синглетный перенос энергии осуществляется эффективно даже в тех случаях, когда расстояние между донором и акцептором превышает 70 Å. Этот метод идеально подходит для исследова-

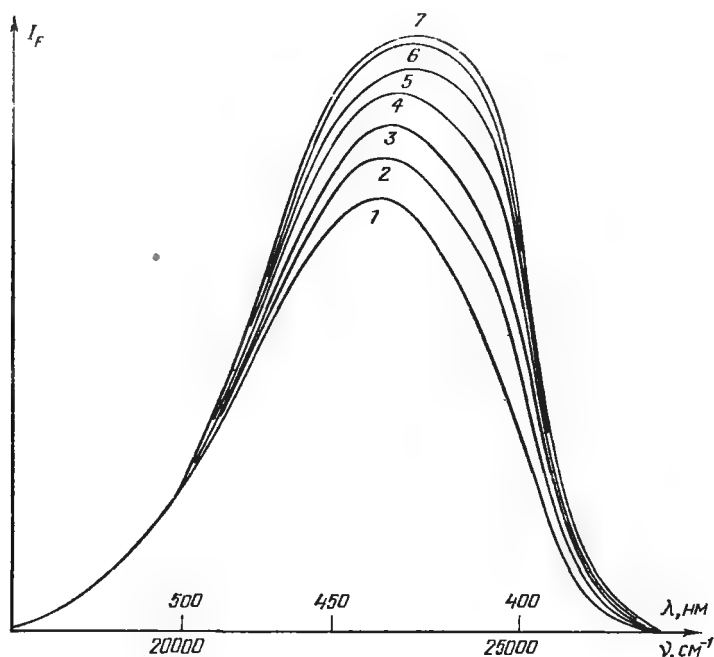


Рис. 8.14. Спектры флуоресценции (зависимость интенсивности I_F от волнового числа ν) анилинонафтиспектрина в отсутствие липида (1) и в присутствии фосфатидилсериновых липосом при концентрациях липида 0,095 мМ (2); 0,185 мМ (3); 0,36 мМ (4); 0,53 мМ (5); 0,69 мМ (6) и 0,85—1,0 мМ (насыщение) (7). Концентрация спектрина равна 0,2 мкМ; температура 30 °С. Согласно этим данным, в насыщении на один димер спектрина приходится 1500 молекул фосфатидилсерина; константа связывания составляет $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Добавление фосфатидилхолиновых липосом к белку не вызывает никаких изменений спектра флуоресценции меченого спектрина. (Из работы [110] с разрешения авторов.)

ния связывания растворимых периферических белков с липидным бислоем: если флуорофор поместить на внутренней стороне бислоя, а значит, далеко от центра связывания белка, можно свести к минимуму возможное влияние его на белково-липидные взаимодействия. Применение метода описано в работах [100—112].

5.1.4. Другие методы

Специфичность белково-липидных взаимодействий в реконструированных мембранных системах можно исследовать с помощью методов комбинационного рассеяния и инфракрасной спектроскопии. Например, если белок встроить в бислой, образованный смесью двух липидов, жирнокислотная цепь одного из которых дейтерирована, то, определяя ширину соответствующих $C-H$ и $C-D$ -колебательных полос, можно оценить величину относительного сродства белка к этим липидам [113].

Ценные данные о специфичности взаимодействия периферических мембранных белков с липидами дают исследования свойств липидного монослоя на границе раздела фаз воздух—вода. Растворенный белок добавляют в водную субфазу и регистрируют изменения поверхностного натяжения монослоя $\Delta\pi$, обусловленные связыванием или частичным проникновением белка в липид. $\Delta\pi$ уменьшается при увеличении начального поверхностного натяжения π_i , приложенного к монослою. Особенно важным параметром, характеризующим взаимодействие, является предельное значение π_{i0} , выше которого $\Delta\pi$ равно нулю. Зная эту величину, можно судить о характере взаимодействия в живых системах [114]. Соответствующий пример представлен на рис. 8.15. Этот метод требует наличия полностью свободного от детергента белка, поэтому применять его к интегральным мембранным белкам можно только в том случае, если последние могут быть выделены без детергента и при этом не утрачивают природную способность связывать липиды [115].

Центры прочного связывания липидов на солюбилизованных, свободных от детергента периферических или интегральных белках можно обнаружить, изучая связывание методом равновесного диализа. При этом иногда приходится использовать более растворимые в воде производные липидов (например, дезоксихолевую кислоту вместо экипростанола) [116].

В мембранах некоторых аэробных бактерий, выращенных в присутствии только одной жирной кислоты, или в реконструированных мембранных системах часть липидных молекул может не участвовать в температурных фазовых переходах. Зная размер такой фракции, можно определить число молекул аннулярных липидов, связанных с молекулой интегрального белка.

Полученная таким образом величина бывает обычно выше, чем найденная методом ЭПР [117, 118] (см. также разд. 5.3).

5.2. Влияние липидов на структуру белка

Не вызывает сомнения, что специфическая укладка полипептидных цепей всех интегральных и некоторых периферических мембранных белков определяется и стабилизируется окружающими липидными молекулами. Для изучения этого явления лучше подходят реконструированные, чем природные мембранные системы, поскольку имеется возможность варьировать липидный состав. Определение зависимости функциональных свойств белка от состава липидов — это наиболее прямой и чувствительный способ изучения индуцируемых липидом конформационных изменений белка и их специфичности. Однако функциональные изменения еще не дают представления о лежащих в их основе структурных перестройках. Для изучения структурных изменений приходится применять физические методы. Для этого пригодны любые методы, чувствительные к изменениям структуры или динамики белков (разд. 2.4 и 2.5), например КД и флуоресцентная спектроскопия. Применение их к аполипипротенам сыворотки описано в работах [119, 120].

Изучение индуцируемых липидами изменений структуры и функции белков с помощью реконструированных мембранных

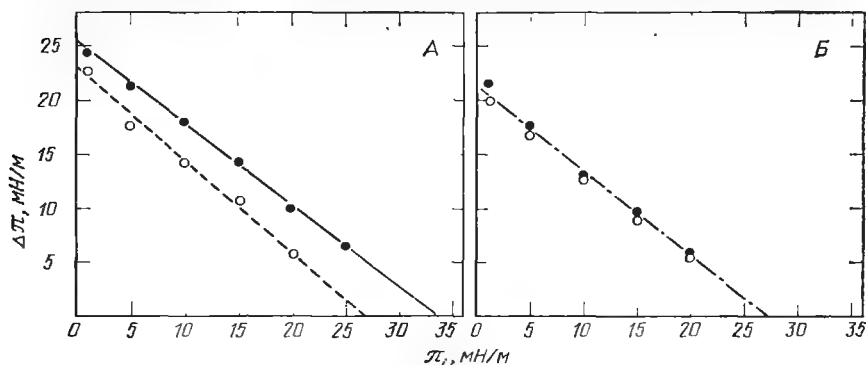


Рис. 8.15. Взаимодействие спектриновых полипептидов (полосы 1 и 2) из мембран эритроцитов человека с монослоями из фосфатидилсерина мозга быка (А) и яичного фосфатидилхолина (Б) на границе раздела фаз воздух — вода: зависимость увеличения поверхностного натяжения $\Delta\pi$, обусловленного добавлением белка, от исходного поверхностного натяжения π . Светлые кружки — полипептид полосы 1, темные — полипептид полосы 2. Начальная концентрация белка в субфазе 7,5 мкг/мл. Взаимодействие имеет физиологический смысл, только когда π_0 , предельное значение π , при котором $\Delta\pi=0$, больше 31 мН/м. Этому условию удовлетворяет лишь пара фосфатидилсерин — белок полосы 2. (Из работы [114] с разрешения авторов.)

систем встречается с двумя серьезными трудностями. 1. Обнаруженная в функциональных тестах специфичность данного липида может объясняться не тем, что этот липид нужен для работы белка, а тем, что без него выделенный белок не встраивается в липидный бислой [121]. Аналогично любые изменения конформации белка, наблюдаемые при реконструкции, могут быть связаны не с природными белково-липидными взаимодействиями, а с восстановлением под действием липида нативной конформации белка, частично денатурированного в ходе выделения. 2. Происходящие при связывании белка с липидным бислом спектральные изменения, особенно изменения спектра флуоресценции и кругового дихроизма в ближней УФ-области, вовсе не обязательно обусловлены конформационными перестройками. Они могут объясняться просто изменением полярности окружения.

5.3. Влияние белка на структуру и подвижность липидов

Согласно имеющимся экспериментальным данным, мембранные белки могут влиять на мембранные липиды следующим образом:

- 1) изменять молекулярную упорядоченность и ограничивать подвижность аннулярных липидов;
- 2) аналогичным образом изменять «вторичные» липидные слои, соседние с аннулярными;
- 3) вызывать изменения упорядоченности и характера низкочастотных движений всей липидной фазы;
- 4) индуцировать разделение фаз в липидном бислое;
- 5) индуцировать или стабилизировать асимметрию бислоя.

5.3.1. Подвижность аннулярных липидов

Подвижность аннулярных липидов лучше всего исследовать с помощью ЭПР спин-меченных липидов, о чем уже говорилось в разд. 5.1.1.

5.3.2. Липиды, прилегающие к аннулярному слою

Свойства липидов в областях, прилегающих к аннулярному слою, можно попытаться исследовать калориметрическими методами. Например, с помощью высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума, встроенной в везикулы из фосфатидилхолина, удалось выявить три типа дополнительных пиков теплоемкости, один из которых был приписан «вторичным» доменам с нарушенной упаковкой липидов. Аналогичные резуль-

таты можно получить, измеряя анизотропию флуоресценции дифенилгексатриена или сходных флуоресцентных меток, введенных в липид [122]. По-видимому, в более ранних работах авторам с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии не удалось разделить эти вторичные домены и аннулярные липиды, поэтому они получили завышенное значение количества аннулярных липидов по сравнению с данными ЭПР (см. разд. 5.1.1).

5.3.3. Упорядоченность и низкочастотная подвижность фосфолипидов суммарной липидной фазы

О влиянии белков на липиды, не входящие в аннулярный слой или «вторичные» домены, можно судить, следя за изменениями спектров ЭПР спин-меченных липидов или спектров ^2H -ЯМР дейтерированных липидов. В первом случае для этого сравнивают «подвижный» спектральный компонент белково-липидной системы (разд. 5.1.1) и спектр чистого липида [66, 101, 123], а во втором — сигнал (уширенный) белково-липидной системы с сигналом чистого липида [43, 44]. В случае ЭПР «подвижный» компонент спектра может содержать вклад липидов «вторичных» доменов, а в случае ЯМР в сигнал дают вклад липиды и аннулярного слоя, и «вторичных» доменов. Тем не менее оба метода позволяют оценить подвижность и упорядоченность суммарной липидной фазы [43, 66, 101, 123—125].

Недавно сообщалось об успешном применении метода деполаризации флуоресценции для изучения взаимодействия белков и липидов на относительно больших расстояниях [126]. В основе метода лежит эффект тушения флуоресценции погруженной в липидную фазу метки вследствие переноса энергии на окружающие молекулы белка, содержащие подходящий акцептор. Определяемый из конечного значения анизотропии флуоресценции метки параметр упорядоченности липидов (разд. 3.2.3) не зависит от ближайшего окружения белка, т. е. он отражает подвижность липидов, находящихся снаружи от аннулярного слоя, и «вторичных» доменов [126].

5.3.4. Фазовое разделение липидов

Индуктируемое белками латеральное разделение фаз в липидном бислое можно изучать теми же методами, что и в чистых липидных системах (разд. 3.3). Кроме того, весьма информативным бывает метод ^{31}P -ЯМР: мембранные белки могут индуцировать образование в бислое областей, включенных в гексагональную фазу [127], или, наоборот, включенных в бислой доменов гексагональной фазы [128], а эти переходы несложно регистрировать методом ЯМР (разд. 3.2.1).

5.3.5. Асимметрия липидов

Индуктируемое или стабилизируемое белками асимметричное распределение липидов между двумя монослоями в биологической или реконструированной мембране, как и соответствующую асимметрию в искусственных липидных везикулах, изучают в основном биохимическими методами [129]. Из физических методов применяют ^{31}P - и ^{13}C -ЯМР, описанные в разд. 4.5.2 и работах [97, 98], но только к реконструированным системам (не к целым клеткам). Изучать трансбислойное распределение стероидов можно методом тушения флуоресценции соответствующих производных [100, 130] либо спектрофотометрически по кинетике связывания полиенового антибиотика филипина с мембранными стероидами [131]. Впрочем, в последнем случае могут возникать определенные трудности при интерпретации результатов [100], и при регистрации асимметрии распределения липидов полученные этими методами данные необходимо дополнить другими измерениями (включая биохимические) (см. работы [132, 133]).

6. Перспективы

Вероятно, в ближайшем будущем для исследования биологических мембран будет использоваться гораздо больше физических методов, причем более чувствительных. Возможно, определенных успехов удастся достичь в получении количественных оценок (это касается, например, ЭПР с переносом насыщения), что существенно повысит ценность методов. Но основной прогресс должен быть достигнут в области препаративной биохимии, например в получении трехмерных кристаллов мембранных белков, пригодных для рентгеноструктурного анализа, специфически дейтерированных белков и липидов для исследования их методом рассеяния нейтронов и ЯМР, а также более гомогенных в структурном отношении реконструированных систем мембранного транспорта. Все это, вероятно, еще более повысило бы информативность биофизических подходов и их ценность для дальнейшего исследования биомембран.

7. Благодарности

Я некрепне благодарен д-рам J. B. C. Findlay, H. Passow, H. Ruf, P. Wood за многочисленные плодотворные обсуждения этой главы, а также моей жене за помощь в подготовке рукописи.

Литература

1. Tanford C., Reynolds J. A. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 133.
2. Hames B. D. (1981). In: *Gel Electrophoresis of Proteins — A Practical Approach*. Hames B. D. (ed.), IRL Press, Oxford and Washington, p. 1.
3. Peters K., Richards F. M. (1977). *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 523.
4. Dorst H.-J., Schubert D. (1979). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1605.
5. Ji T. H., Middaugh C. R. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **603**, 371.
6. Eason R. (1984). In: *Centrifugation — A Practical Approach*. Rickwood D. (ed.), IRL Press, Oxford and Washington, p. 251.
7. Fujita H. (1975). *Foundations of Ultracentrifugal Analysis*. Wiley, New York.
8. Schubert D., Boss K., Dorst H.-J., Flossdorf J., Pappert G. (1983). *FEBS Lett.*, **163**, 81.
9. Cantor C. R., Schimmel P. R. (1980). *Biophysical Chemistry. Part II*, Freeman and Company, San Francisco.
10. Kühn H., Bennett N., Michel-Villaz M., Chabre M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6873.
11. Kempner E. S., Schlegel W. (1979). *Anal. Biochem.*, **92**, 2.
12. Verkman A. S., Skorecki K., Ausiello D. A. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 150.
13. Pilz I. (1973). In: *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry. Part C*, Leach S. J. (ed.), Academic Press, New York and London, p. 141.
14. Franks N. P., Levine Y. K. (1981). In: *Membrane Spectroscopy*. Grell E. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, p. 437.
15. Blasie J. K., Herbette L., Pachence J. (1985). *J. Membr. Biol.*, **86**, 1.
16. Blasie J. K., Herbette L., Pascolini D., Skita V., Pierce D. H., Scarpa A. (1985). *Biophys. J.*, **48**, 9.
17. Slayter E. M. (1969). In: *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry. Part A*, Leach S. J. (ed.), Academic Press, New York and London, p. 1.
18. Branton D., Cohen C. M., Tyler J. (1981). *Cell*, **24**, 24.
19. Tanford C. (1961). *Physical Chemistry of Macromolecules*. Wiley, New York.
20. Makowski L., Li J. (1984). In: *Biomembrane Structure and Function*. Chapman D. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, p. 43.
21. Michel H. (1983). *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 56.
22. Garavito R. M., Jenkins J., Jansonius J. N., Karlsson R., Rosenbusch J. P. (1983). *J. Mol. Biol.*, **164**, 313.
23. Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H. (1985). *Nature*, **318**, 618.
24. Kossiakoff A. A. (1985). *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 1195.
25. Engel A., Massalski A., Schindler H., Dorset D. L., Rosenbusch J. P. (1985). *Nature*, **317**, 643.
26. Glaeser R. M. (1982). In: *Methods of Experimental Physics, Vol. 20 (Biophysics)*. Ehrenstein G., Lecar H. (eds.), Academic Press, New York and London, p. 391.
27. Henderson R., Unwin P. N. T. (1975). *Nature*, **257**, 28.
28. Sears D. W., Beychok S. (1973). In: *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry. Part C*, Leach S. J. (ed.), Academic Press, New York and London, p. 446.
29. Long M. M., Urry D. W. (1981). In: *Membrane Spectroscopy*. Grell E. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, p. 143.
30. Jap B. K., Maestre M. F., Hayward S. B., Glaeser R. M. (1983). *Biophys. J.*, **43**, 81.
31. Amey R. L., Chapman D. (1984). In: *Biomembrane Structure and Function*. Chapman D. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, p. 199.

32. Lord R. C., Mendelsohn R. (1981). In: Membrane Spectroscopy. Grell E. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, p. 377.
33. Gurd F. R. N., Rothgeb T. M. (1979). Adv. Protein Chem., 33, 73.
34. Munro I., Pecht I., Stryer L. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 56.
35. Keniry M. A., Gutowsky H. S., Oldfield E. (1984). Nature, 307, 383.
36. Tardieu A., Luzatti V., Reman F. C. (1973). J. Mol. Biol., 75, 711.
37. Chapman D. (1975). Q. Rev. Biophys., 8, 185.
38. Chapman D., Williams R. M., Ladbroke B. D. (1967). Chem. Phys. Lipids, 1, 445.
39. Bach D. (1984). In: Biomembrane Structure and Function. Chapman D. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, p. 1.
40. Bueldt G., Gally H. U., Seelig J., Zaccai G. (1979). J. Mol. Biol., 134, 673.
41. Zaccai G., Bueldt G., Seelig A., Seelig J. (1979). J. Mol. Biol., 134, 693.
42. Schuh J. R., Chan S. I. (1982). In: Methods of Experimental Physics. Vol. 20 (Biophysics), Ehrenstein G., Lecar H. (eds.), Academic Press, New York and London, p. 1.
43. Seelig J., Seelig A. (1980). Q. Rev. Biophys., 13, 19.
44. Chan S. I., Bocian D. F., Petersen N. O. (1981). In: Membrane Spectroscopy. Grell E. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, p. 1.
45. Cullis P. R., de Kruijff B. (1979). Biochim. Biophys. Acta, 559, 399.
46. Cullis P. R., de Kruijff B. (1976). Biochim. Biophys. Acta, 436, 523.
47. Cullis P. R., de Kruijff B. (1978). Biochim. Biophys. Acta, 507, 207.
48. Schreier S., Polnaszek C. F., Smith I. C. P. (1978). Biochim. Biophys. Acta, 515, 375.
49. Seelig J., Niederberger W. (1974). Biochemistry, 13, 1585.
50. Petersen N. O., Chan S. I. (1977). Biochemistry, 16, 2657.
51. Chen R. F., Edelhoch H., Steiner R. F. (1969). In: Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry. Part A, Leach S. J. (ed.), Academic Press, New York and London, p. 171.
52. Yguerabide J., Foster M. C. (1981). In: Membrane Spectroscopy. Grell E. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, p. 199.
53. Jaehnig F. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6361.
54. Heyn M. P. (1979). FEBS Lett., 108, 359.
55. Knoll W., Schmidt G., Ibel K., Sackmann E. (1985). Biochemistry, 24, 5240.
56. Gebhardt C., Gruler H., Sackmann E. (1977). Z. Naturforsch., 32c, 581.
57. Sklar L. A., Hudston B. S., Simoni R. D. (1977). Biochemistry, 16, 819.
58. Peters R., Beck K. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7183.
59. Zingsheim H. P., Plattner H. (1976). In: Methods in Membrane Biology. Korn E. D. (ed.), Plenum Press, New York and London, Vol. 7, p. 1.
60. Lentz B. R., Barrow D. A., Hoechli M. (1980). Biochemistry, 19, 1943.
61. Severs N. J., Robenek H. (1983). Biochim. Biophys. Acta, 737, 373.
62. Traeble H., Haynes D. H. (1971). Chem. Phys. Lipids, 7, 324.
63. Brown M. F., Williams G. D. (1985). J. Biochem. Biophys. Methods, 11, 71.
64. Lee A. G., Birdsall N. J. M., Metcalfe J. C. (1974). In: Methods in Membrane Biology. Korn E. D. (ed.), Plenum Press, New York and London, Vol. 2, p. 1.
65. Smith R. L., Oldfield E. (1984). Science, 225, 280.
66. Marsh D. (1981). In: Membrane Spectroscopy. Grell E. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, p. 51.
67. Shinitzky M., Barenholz Y. (1978). Biochim. Biophys. Acta, 515, 367.
68. Cherry R. J. (1979). Biochim. Biophys. Acta, 559, 289.
69. Corin A. F., Matayoshi E. D., Jovin T. M. (1985). In: Spectroscopy and the Dynamics of Molecular Biological Systems. Bayley P. M., Dale R. E. (eds.), Academic Press, New York, p. 53.

70. *Cherry R. J.* (1985). In: *Spectroscopy and the Dynamics of Molecular Biological Systems*. Bayley P. M., Dale R. E. (eds.), Academic Press, New York, p. 79.
71. *Garland P. B., Johnson P.* (1985). In: *Spectroscopy and the Dynamics of Molecular Biological Systems*. Bayley P. M., Dale R. E. (eds.), Academic Press, New York, p. 95.
72. *Hoffmann W., Restall C. J.* (1934). In: *Biomembrane Structure and Function*. Chapman D. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, p. 257.
73. *Johnson P., Garland P. G.* (1981). *FEBS Lett.*, **132**, 252.
74. *Cherry R. J., Godfrey R. E.* (1981). *Biophys. J.*, **36**, 257.
75. *Thomas D. D., Eads T. M., Barnett V. A., Lindahl K. M., Momont D. A., Squier T. C.* (1985). In: *Spectroscopy and the Dynamics of Molecular Biological Systems*. Bayley P. M., Dale R. E. (eds.), Academic Press, New York, p. 239.
76. *Thomas D. D., Dalton L. R., Hyde J. S.* (1976). *J. Chem. Phys.*, **65**, 3006.
77. *Delmelle M., Butler K. W., Smith I. C. P.* (1980). *Biochemistry*, **19**, 698.
78. *Marsh D.* (1980). *Biochemistry*, **19**, 1632.
79. *Opella S. J., Yesinowski J. P., Waugh J. S.* (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3812.
80. *Peters R.* (1981). *Cell Biol. Int. Rep.*, **5**, 733.
81. *Axelrod D.* (1985). In: *Spectroscopy and the Dynamics of Molecular Biological Systems*. Bayley P. M., Dale R. E. (eds.), Academic Press, New York, p. 163.
82. *Peters R., Bruenger A., Schulten K.* (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 962.
83. *Axelrod D., Koppel D. E., Schlessinger J., Elson E. L., Webb W. W.* (1976). *Biophys. J.*, **16**, 1055.
84. *Golan D. E., Veatch W.* (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2537.
85. *Traeuble H., Sackmann E.* (1972). *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4499.
86. *Sackmann E., Traeuble H., Galla H.-J., Overath P.* (1973). *Biochemistry*, **12**, 5360.
87. *Kuo A.-L., Wade C. G.* (1979). *Biochemistry*, **18**, 2300.
88. *Cullis P. R.* (1976). *FEBS Lett.*, **70**, 223.
89. *Sheats J. R., McConnell H. M.* (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4661.
90. *Koppel D. E., Axelrod D., Schlessinger J., Elson E. L., Webb W. W.* (1976). *Biophys. J.*, **16**, 1315.
91. *Fahey P. F., Webb W. W.* (1978). *Biochemistry*, **17**, 3046.
92. *Rothman J. E., Tsai D. K., Dawidowicz E. A., Lenard J.* (1976). *Biochemistry*, **15**, 2361.
93. *Dicorleto P. E., Zilversmit D. B.* (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **552**, 114.
94. *Roseman M., Litman B. J., Thompson T. E.* (1975). *Biochemistry*, **14**, 4826.
95. *Kornberg R. D., McConnell H. M.* (1971). *Biochemistry*, **10**, 1111.
96. *Rousselet A., Guthmann C., Matricon J., Bienvenue A., Devaux P. F.* (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 357.
97. *Bystrov V. F., Shapiro Y. E., Viktorov A. V., Barsukov L. I., Bergelson L. D.* (1972). *FEBS Lett.*, **25**, 337.
98. *Shapiro Y. E., Viktorov A. V., Volkova V. I., Barsukov L. I., Bystrov V. F., Bergelson L. D.* (1975). *Chem. Phys. Lipids*, **14**, 227.
99. *De Kruijff B., Wirtz K. W. A.* (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **468**, 318.
100. *Devaux P. F., Seigneuret M.* (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 63.
101. *Jost P. C., Capaldi R. A., Vanderkooi G., Griffith O. H.* (1973). *J. Supramol. Struct.*, **1**, 269.
102. *Hoffmann W., Pink D. A., Restall J., Chapman D.* (1981). *Eur. J. Biochem.*, **114**, 585.

103. Andersen J. P., Fellmann P., Moller J. V., Devaux P. F. (1981). *Biochemistry*, 20, 4928.
104. Marsh D., Watts A., Pates R. D., Uhl R., Knowles P. F., Esmann M. (1982). *Biophys. J.*, 37, 265.
105. East J. M., Melville D., Lee A. G. (1985). *Biochemistry*, 24, 2615.
106. Awasthi Y. C., Chuang T. F., Keenan T. W., Crane F. L. (1971). *Biochim. Biophys. Acta*, 226, 42.
107. Anderson R. A., Marchesi V. T. (1985). *Nature*, 318, 295.
108. London E., Feigenson G. W. (1981). *Biochemistry*, 20, 1939.
109. East J. M., Lee A. G. (1982). *Biochemistry*, 21, 4144.
110. Bonnet D., Begard E. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 344.
111. Teissie J. (1981). *Biochemistry*, 20, 1554.
112. Sato S. B., Ohnishi S. I. (1983). *Eur. J. Biochem.*, 130, 19.
113. Mendelsohn R., Dluhy R. A., Crawford T., Mantsch H. H. (1984). *Biochemistry*, 23, 1498.
114. Schubert D., Herbst F., Marie H., Rudloff V. (1982). In: *Protides of the Biological Fluids*. Proc. 29th Coll. 1981, Peeters H. (ed.), Pergamon Press, Oxford and New York, p. 121.
115. Klappauf E., Schubert D. (1979). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 360, 1225.
116. Passing R., Schubert D. (1983). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 364, 219.
117. Trauble H., Overath P. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, 307, 491.
118. Rigell C. W., de Saussure C., Freire E. (1985). *Biochemistry*, 24, 5638.
119. Lux S. E., Hirz R., Shrager R. I., Gotto A. M. (1972). *J. Biol. Chem.*, 247, 2598.
120. Jonas A., Krajnovich D. J. (1977). *J. Biol. Chem.*, 252, 2194.
121. Eytan G. D. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, 694, 185.
122. Lentz B. R., Clubb K. W., Alford D. R., Hoechli M., Meissner G. (1985). *Biochemistry*, 24, 433.
123. Marsh D. (1983). *Trends Biochem. Sci.*, 8, 330.
124. Rice D. M., Meadows M. D., Scheinman A. O., Goni F. M., Gómez-Fernández J. C., Moscarello M. A., Chapman D., Oldfield E. (1979). *Biochemistry*, 18, 5893.
125. Borle F., Seelig J. (1983). *Biochemistry*, 22, 5536.
126. Rehorek M., Dencher N. A., Heyn M. P. (1985). *Biochemistry*, 24, 5980.
127. Tarashi T. F., De Kruijff B., Verkleij A. J., Van Echteld C. J. A. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, 685, 153.
128. Van Echteld C. J. A., Van Stigt R., De Kruijff B., Leunissen Bijvelt J., Verkleij A. J., De Gier J. (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, 648, 287.
129. Etemadi A.-H. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, 604, 423.
130. Hale J. E., Schroeder F. (1982). *Eur. J. Biochem.*, 122, 649.
131. Bitman R. (1978). *Lipids*, 13, 686.
132. Dressler V., Haest C. W. M., Plasa G., Deuticke B., Erusalimsky J. D. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, 775, 189.
133. Seigneuret M., Devaux P. F. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3751.

СВОЙСТВА МАТЕРИАЛОВ, ИСПОЛЗУЕМЫХ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ

1. Характеристики растворов сахарозы

Концентрация, %		Молярность	Плотность, г/мл		Показатель преломления		Вязкость, сантимпуаз	
В/В	В/О		5°	20°	5°	20°	5°	20°
0	0	0	1,0004	0,9882	1,3345	1,3330	1,515	1,000
2	2,01	0,059	1,0078	1,0060	1,3375	1,3359	1,585	1,053
4	4,06	0,118	1,0157	1,0139	1,3407	1,3388	1,674	1,112
6	6,13	0,179	1,0237	1,0218	1,3437	1,3418	1,780	1,177
8	8,24	0,241*	1,0318	1,0299	1,3467	1,3448	1,905	1,251
10	10,38	0,303	1,0400	1,0381	1,3497	1,3478	2,057	1,333
12	12,56	0,367	1,0483	1,0465	1,3530	1,3509	2,220	1,426
14	14,77	0,431	1,0568	1,0549	1,3562	1,3541	2,410	1,531
16	17,02	0,497	1,0653	1,0635	1,3593	1,3573	2,635	1,650
18	19,30	0,564	1,0740	1,0722	1,3625	1,3605	2,875	1,786
20	21,62	0,632	1,0829	1,0810	1,3646	1,3638	3,137	1,945
22	23,98	0,700	1,0918	1,0899	1,3692	1,3672	3,460	2,124
24	26,38	0,771	1,1009	1,0990	1,3724	1,3706	3,838	2,331
26	28,81	0,842	1,1101	1,1081	1,3757	1,3740	4,282	2,573
28	31,29	0,914	1,1195	1,1175	1,3792	1,3775	4,807	2,855
30	33,81	0,988	1,1290	1,1270	1,3826	1,3811	5,435	3,187
32	36,37	1,063	1,1386	1,1366	1,3864	1,3847	6,187	3,581
34	38,98	1,139	1,1484	1,1464	1,3900	1,3884	7,106	4,052
36	41,62	1,216	1,1583	1,1562	1,3937	1,3921	8,234	4,621
38	44,32	1,295	1,1683	1,1663	1,3975	1,3959	9,651	5,315
40	47,06	1,375	1,1785	1,1765	1,4018	1,3998	11,44	6,167
42	49,84	1,456	1,1889	1,1867	1,4055	1,4037	13,76	7,234
44	52,68	1,539	1,1994	1,1973	1,4096	1,4076	16,77	8,579
46	55,56	1,623	1,2100	1,2078	1,4139	1,4117	20,72	10,30
48	58,49	1,709	1,2208	1,2186	1,4181	1,4158	25,99	12,51
50	61,48	1,796	1,2327	1,2296	1,4225	1,4199	33,18	15,43
52	64,51	1,885	1,2428	1,2406	1,4268	1,4242	43,18	19,34
54	67,60	1,975	1,2541	1,2519	1,4313	1,4284	57,42	24,68
56	70,74	2,067	1,2655	1,2632	1,4356	1,4328	78,27	32,12
58	73,94	2,160	1,2770	1,2748	1,4400	1,4372	109,5	42,78
60	77,19	2,255	1,2887	1,2865	1,4445	1,4417	159,1	58,49

3. Характеристики растворов найкоденза

Концентрация, % (г/о)	Концентрация, М	Показатель преломления при 20°C	Плотность при 20°C, г/мл	Осмотическая осмосм	Вязкость
0	0	1,3330	0,999	0	1,0
10	0,122	1,3494	1,052	112	1,3
20	0,244	1,3659	1,105	211	1,4
30	0,365	1,3824	1,159	299	1,8
40	0,487	1,3988	1,212	388	3,2
50	0,609	1,4153	1,265	485	5,3
60	0,731	1,4318	1,319	595	9,5
70	0,853	1,4482	1,372	1045	17,2
80	0,974	1,4647	1,426	—	30,0

4. Характеристики водных растворов фикола при 4°C [2]

Концентрация, %

г/г	г/о	Показатель преломления	Плотность, г/мл	Вязкость, сантипуаз
0,00	0,000	1,3346	1,0004	1,564
3,00	3,032	1,3382	1,0106	2,788
4,00	4,058	1,3392	1,0145	3,397
5,00	5,090	1,3408	1,0180	4,102
6,00	6,129	1,3420	1,0215	5,014
7,00	7,177	1,3437	1,0253	6,017
8,00	8,232	1,3454	1,0290	7,372
9,00	9,295	1,3469	1,0328	8,579
10,00	10,37	1,3484	1,0365	10,35
12,00	12,53	1,3514	1,0441	14,27
14,00	14,73	1,3538	1,0518	20,21
16,00	16,96	1,3579	1,0597	27,42
18,00	19,21	1,3608	1,0673	38,33
20,00	21,50	1,3645	1,0752	52,31
22,00	23,84	1,3680	1,0837	69,28
24,00	26,21	1,3714	1,0922	95,03
26,00	28,61	1,3748	1,1004	125,7
28,00	31,06	1,3786	1,1093	172,0
30,00	33,53	1,3201	1,1176	225,6
32,00	36,04	1,3856	1,1263	308,8
34,00	38,57	1,3890	1,1345	407,2
36,00	41,19	1,3930	1,1442	565,4
38,00	43,83	1,3970	1,1534	762,2
40,00	46,52	1,4030	1,1629	1020,0

Литература

1. *Rickwood D.* (1984). In: *Centrifugation — A Practical Approach*, (2nd edition), Rickwood D. (ed.), IRL Press Oxford, Washington DC, p. 29.
2. *Pretlow T. G., Boone C. W., Shrager R. I., Weiss G. H.* (1969). *Anal. Biochem.*, **29**, 230.

ФЕРМЕНТЫ — МАРКЕРЫ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ

Фракция		Маркерный фермент	Ссылки	Номер по КФ
Плазматическая мембрана	Базолатеральная	Аденилатциклаза	[1]	4.6.1.1
		Na ⁺ ,K ⁺ -АТРаза	[2]	3.6.1.37
		Рецепторы, например асиалогликопротеин	[3]	
	Апикальная	5'-Нуклеотидаза	[2, 4, 5]	3.1.3.5
		Лейцинаминопептидаза	[6]	3.4.11.1
Эндоплазматический ретикулум		γ-Глутамилтранспептидаза	[7]	2.3.2.12
		Глюкозо-6-фосфатаза	[8, 22]	3.1.3.9
		NADPH-цитохром с — редуктаза	[9]	1.6.2.4
		Эноксидгидролаза	[10]	3.3.2.3
Аппарат Гольджи	Транс-область и средняя область	Галактозилтрансфераза	[11, 12]	2.4.1.38
		Сиалилтрансфераза	[11, 12]	2.4.99.1
Митохондрии	Внутренняя мембрана	NADP-фосфатаза	[13]	3.6.1.22
		Сукцинатдегидрогеназа	[14]	1.3.99.1
		Цитохромоксидаза	[15]	1.9.3.1
	Наружная мембрана	Ротенон-нечувствительная NADH-цитохром с — редуктаза	[16]	1.6.99.1
		Моноаминоксидаза	[17]	1.4.3.4
		Кинуренин-3-гидроксилаза	[18]	1.14.13.9
Лизосомы		Кислая фосфатаза	[19]	3.1.3.2
		β-Глюкуронидаза	[19]	3.2.1.31
Эндосомы		Арилсульфатаза	[20]	3.1.6.1
		Моненсиинактивируемая Mg ²⁺ -АТРаза в сочетании с интактными лигандами	[21]	3.6.1.3
Пероксисомы		Каталаза	[23]	1.11.1.6
		Карнитинпальмитонил-трансфераза	[24]	2.3.1.21
Цитозоль		Лактатдегидрогеназа	[25]	1.1.1.22

Детальное описание методов определения ферментативной активности можно найти в приведенных ссылках, а многие из методик описаны в работе [9]. Характер распределения активности в базолатеральной и апикальной областях плазматической мембраны обсуждается в работе [4], указанной в гл. I. Ферментных маркеров, специфичных для цис-области аппарата Гольджи, не существует. Дальнейшие подробности и обсуждение вопросов, касающихся надежности использования этих маркеров, см. в гл. I и 2.

Литература

1. *Hardman J. C., O'Malley B. W.* (1974). *Methods Enzymol.* **38C**, 49.
2. *Avruch J., Wallach D. F. H.* (1971). *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 334.
3. *Hubbard A. L., Wall D. A., Ma A.* (1983). *J. Cell Biol.*, **96**, 217.
4. *Chatterjee S. K., Battacharya M., Barlow J. J.* (1979). *Anal. Biochem.*, **95**, 497.
5. *Ipata P. L.* (1967). *Anal. Biochem.*, **20**, 30.
6. *Goldbarg J. A., Rutenberg A. M.* (1958). *Cancer*, **11**, 283.
7. *Inoue M. S., Horiuchi S., Morino Y.* (1977). *Eur. J. Biochem.*, **73**, 335.
8. *Aronson N. N., Touster O.* (1974). *Methods Enzymol.*, **31**, 90.
9. *Sottocasa G. L., Kuylensstierna B., Ernster L., Bergstrand A.* (1967). *J. Cell Biol.*, **32**, 415.
10. *Galteau M. M., Antoine B., Reggio H.* (1985). *EMBO J.*, **4**, 2793.
11. *Vischer P., Reutter W.* (1978). *Eur. J. Biochem.*, **84**, 363.
12. *Bergeron J. J. M., Ehrenreich J. H., Siekevitz P., Palade G. E.* (1973). *J. Cell Biol.*, **59**, 73.
13. *Navas P., Minnifield N., Sun I., Morré D. J.* (1986). *Biochim. Biophys. Acta*, **881**, 1.
14. *Earl D. C. N., Korner A.* (1965). *Biochem. J.*, **94**, 721.
15. *Sun F. F., Crane F. L.* (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 417.
16. *Fleischer S., Fleischer B.* (1967). *Methods Enzymol.*, **10**, 427.
17. *Schnaitman C., Erwin V. G., Greenawalt J. W.* (1967). *J. Cell Biol.* **32**, 719.
18. *Hayashi O.* (1962). *Methods Enzymol.*, **5**, 807.
19. *Gianetto R., de Duve C.* (1955). *Biochem. J.*, **59**, 433.
20. *Chang P. L., Rosa N. E., Davidson R. G.* (1981). *Anal. Biochem.*, **117**, 382.
21. *Saermark T., Flint N., Evans W. H.* (1985). *Biochem. J.*, **225**, 51.
22. *Gierow P., Jergil B.* (1980). *Anal. Biochem.*, **101**, 305.
23. *Thompson J. F., Nance S. L., Tollaksen S. L.* (1978). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **157**, 33.
24. *Markwell M. A. K., McGroarty E. J., Bieber L. L., Tolbert N. E.* (1973). *J. Biol. Chem.*, **248**, 3426.
25. *Neilands J.* (1955). *Methods Enzymol.*, **1**, 449.

АНАЛИЗ РЕЦЕПТОРОВ

А. Сивапрадарао, Джон Б. Финдлей

1. Мембраносвязанные рецепторы

Анализ мембраносвязанных рецепторов обычно проводят, инкубируя клетки или мембраны с радиоактивно меченным лигандом до установления равновесия и затем отделяя свободный лиганд от связанного. Для этого используют целый ряд методов, в том числе фильтрование (через стеклянные, целлюлозоацетатные, нейлоновые, тефлоновые фильтры и центрифугирование). Клетки и мембраны остаются на фильтре или осаждаются центрифугированием; их затем тщательно промывают для удаления избытка лиганда (при условии, что константы диссоциации комплекса рецептор — лиганд ниже 10^{-7} М). Чтобы определить уровень неспецифического (без насыщения) связывания, проводят параллельную инкубацию с 200-600-кратным избытком (по молям) немеченого лиганда. Фильтрование позволяет быстро проводить анализ. Этот метод дает надежные результаты при условии, что связывание радиоактивно меченого лиганда с самим фильтром невелико по сравнению с его связыванием с мембранами и что промывание не приводит к существенной диссоциации комплекса лиганд — рецептор. Достаточно эффективно и центрифугирование клеток и мембран, особенно если отделение свободного лиганда от связанного проводить с использованием несмешивающегося с водой масла. Эта процедура дает ряд преимуществ. Во-первых, отпадает необходимость в промывании осадка, поскольку фон сразу является достаточно низким; во-вторых, быстрота этого процесса позволяет измерять связывание в случае быстро диссоциирующих систем рецептор — лиганд.

Чтобы обеспечить количественный выход клеток или мембран после центрифугирования, необходимо подобрать такое масло, которое имеет плотность, промежуточную между плотностью клеток и водной среды. Масляные среды с различной плотностью можно получить, смешивая в разных соотношениях фталатные эфиры коротких (цепочка из 2—4 углеродных атомов) и длинных (8—9 атомов) алифатических спиртов. Обычно аликвоту инкубационной смеси наносят сверху на слой масла и затем центрифугируют. Часто проводят инкубацию рецептора с лигандом непосредственно на поверхности слоя масла. Ниже описана методика определения рецептора для ретинолсвязывающего белка (РСБ) плазмы крови. Эту методику легко приспособить для анализа многих других рецепторных систем.

1.1. Реагенты

- [¹²⁵I]-PCB:** 0,5 нмоля PCB иодируют посредством Na[¹²⁵I] (1 мКи) с помощью ферментсодержащих гранул (разд. 6.1.1 гл. 6). Отделяют [¹²⁵I]-PCB от избытка ¹²⁵I на колонке с сефадексом G-75 (60×1 см), промывая ее 0,2%-ным раствором яичного альбумина, содержащим 20 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,4 (буфер PBS). Разбавляют [¹²⁵I]-PCB буфером, используемым для анализа, так чтобы активность 50 мкл раствора составляла около 50 000 имп/мин (0,2—0,5 нмоля белка).
- Буфер для анализа:** 0,2%-ный раствор яичного альбумина в буфере, содержащем 20 мМ фосфат натрия и 150 мМ NaCl, pH 7,4. 20 мкМ раствор в буфере для анализа, не содержащем альбумина.
- PCB:** 20 мкМ раствор в буфере для анализа, не содержащем альбумина.
- Мембраны плаценты:** Суспендируют мембраны щеточной каемки плаценты человека (5,0 мг/мл) [1] в буфере для анализа.
- Смесь масел:** Смешивают 60 мл дибутилфталата с 40 мл динонилфталата (конечная плотность 1,012; масла получены от фирмы Aldrich Chemical Co.).

1.2. Методика

1. Берут два комплекта микроэппендорфовских пробирок (Sarstedt 72/702, по три пробирки на одно определение) и заполняют их наполовину масляной смесью.
2. Наносят 50 мкл раствора [¹²⁵I]-PCB на слой масла.
3. Добавляют по 20 мкл буфера PBS в пробирки комплекта 1 (определение полного связывания).
4. Добавляют по 20 мкл раствора PCB в пробирки комплекта 2 (определение неспецифического связывания).
5. Центрифугируют в течение 15 с при 12 000 g (условия указаны приблизительно; критерием является просветление слоев).
6. Добавляют по 30 мкл суспензии мембран прямо в инкубационную смесь, не касаясь стенок пробирки.
7. Инкубируют при 22 °C в течение 15 мин.
8. Охлаждают во льду в течение 2 мин.
9. Центрифугируют в течение 2 мин при 12 000 g в центрифуге типа Microcentaur.
10. Отсасывают надосадочную жидкость (если необходимо, отбирают аликвоту для измерения радиоактивности).
11. Срезают у пробирок донышко с осадком и определяют радиоактивность на γ-счетчике.
12. Определяют специфическое связывание, вычитая составляющую для неспецифического связывания из суммарной величины.

2. Растворимые рецепторы

Для анализа солюбилизованных рецепторов также необходимо отделить связанный радиоактивно меченный лиганд от свободного после того, как достигнуто состояние равновесного связывания. Для осаждения комплекса рецептор — лиганд обычно используют полиэтиленгликоль [2]. Осадок, образующийся после фильтрования или центрифугирования, промывают растворами, содержащими ПЭГ. Другие методы основаны на связывании комплекса рецептор — лиганд на ионите или иммуносорбенте (разд. 5.2 гл. 3 или разд. 4 гл. 5). Процедуру промывания недавно несколько модифицировали (неопубликованные данные) по сравнению с оригинальной методикой так, чтобы можно было анализировать низкоаффинные и быстро диссоциирующие системы рецептор — лиганд и даже системы, обладающие малой емкостью. Такой подход успешно использовали для идентификации и количественного определения солюбилизованного РСБ-рецептора, который не удавалось обнаружить с помощью обычных методов (например, гель-фильтрации, РЕИ-фильтрации, адсорбции на гидроксилapatite и т. п.).

Описанный здесь метод определения солюбилизованного рецептора в принципе применим для любой рецепторной системы независимо от константы аффинности при условии, что найдена такая концентрация ПЭГ, при которой происходит осаждение комплекса рецептор — лиганд. При этом допустимо соосаждение до 10% свободного лиганда (фоновый уровень). Образующийся при добавлении ПЭГ осадок сначала центрифугируют, затем на него наслаивают смесь масел, содержащую дибутилфталат, и снова центрифугируют. При этом водный слой, содержащий свободный лиганд, перемещается вверх через слой масла, благодаря чему удается отделить почти весь свободный лиганд от осажденного комплекса без нарушения равновесия.

2.1. Реагенты

[¹²⁵ I]-РСБ:	См. выше.
РСБ:	Раствор концентрации 50 мкМ в буфере PBS.
Буфер	20 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,4.
для анализа:	
Буфер	2%-ный нонидет Р40 в буфере для анализа, содержащем 4 мМ MgCl ₂ и 0,2 мМ ФМСФ.
для солюбили-	
зации:	
Солюбили-	К 1 мл суспензии микроворсинок плаценты (10 мг
лизат	белка на 1 мл) добавляют 1 мл буфера для солю-
мембран:	билизации. Кратковременно перемешивают на вор-

γ-Глобу-
лины:
25%-ный
раствор
ПЭГ:

тексе. Инкубируют при 25 °С в течение 20 мин при периодическом перемешивании. Центрифугируют при 105 000 g и 4 °С в течение 60 мин. Собирают надосадочную жидкость и, если она не используется сразу, то хранят ее при —20 °С или во льду.

γ-Глобулины козы (фирма Sigma), 5 мг/мл в 0,1 М фосфате натрия, рН 7,4.

25 г ПЭГ 8000 (фирма Sigma) в конечном объеме 100 мл дистиллированной воды.

2.2. Методика

1. Берут три комплекта эппендорфовских пробирок объемом 0,5 мл (Sarstedt 72/699, по три пробирки на одно определение) и вносят в каждую пробирку по 50 мкл раствора [¹²⁵I]-PCB.

2. В пробирки двух комплектов (комплект 1 для определения суммарного связывания и комплект 2 для определения фона) добавляют по 30 мкл буфера PBS.

3. Добавляют по 30 мкл раствора РСБ в пробирки комплекта 3 (неспецифическое связывание).

4. Добавляют по 20 мкл мембранного солюбилизата в пробирки комплектов 1 и 3.

5. Добавляют по 20 мкл буфера для солюбилизации в пробирки комплекта 2.

6. Инкубируют все пробирки при 22 °С в течение 15 мин.

7. Охлаждают их во льду и затем добавляют во все пробирки по 50 мкл охлажденного раствора γ-глобулина.

8. Добавляют по 100 мкл раствора ПЭГ (удобно использовать для этого эппендорфовскую мультипипетку).

9. Перемешивают на вортексе. Выдерживают во льду в течение 20 мин и затем центрифугируют при 12 000 g в течение 8 мин на центрифуге типа Microcentaur.

10. Наслаивают на инкубационную смесь охлажденный во льду дибутилфталат почти до верха пробирок.

11. Центрифугируют в течение 2 мин в условиях, указанных выше, и затем осторожно отсасывают водный супернатант и лежащий под ним масляный слой.

12. Отрезают у пробирок донышко с осадком и определяют радиоактивность на подходящем γ-счетчике.

13. Рассчитывают уровень специфического связывания так, как описано выше.

Литература

1. Booth A. G., Olaniyan R., Vanderpuye O. A. (1980). Placenta, 1, 327.
2. Cuatrecasas P. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 318.

РЕАГЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Ниже перечислен ряд реагентов, модифицирующих белки, которые можно использовать в мембранных исследованиях, но которые пока не нашли такого применения (гл. 6, разд. 6 и табл. 6.4).

Амино-кислота	Реагенты, которые могут проникать через мембрану	Непроникающие реагенты	Условия и пояснения	Литература
Аргинин	2,3-Бутандион		pH 7—8, 100-кратный мольный избыток, 25 °C, 1 ч. Может осуществлять модификацию по аминокислотным группам	[1]
		Камфохинон-10-сульфоническая кислота	pH 9, 37 °C, до 24 ч, реакция обратима	[2]
	Циклогександион-1,2		pH 9, 35 °C, 2 ч	[3]
	<i>n</i> -Гидрокси- и <i>n</i> -нитрофенилглиоксали		pH 9, 30 °C, 30 мин	[4]
Аспарагин		Бис-(1,1-трифторацетокси)-йодбензол	До сих пор использовался только при анализе аминокислотного состава	[5]
Цистеин		5,5'-Дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (реактив Эллмана)	pH 7,3, 25 °C, мкМ, 1 ч	[6]
		N-(йодфенил)-трифторацетамид	pH 8,0, 25—50 °C, избыток по молям до 50 раз. В результате образуются свободные аминокислоты	[7]

Продолжение

Аминокислота	Реагенты, которые могут проникать через мембрану	Непроникающие реагенты	Условия и пояснения	Литература
Глутамин		4-Хлор-7-сульфобензофураниаммоний (СБФ-хлорид) Бис-(1,1-трифторацетокси)-нодбензол	pH 8,0, 37 °C, 4 ч, мкМ; флуоресцирует, реакция обратима в присутствии 2-меркаптоэтанола Как для аспарагина	[8] [5]
Лизин	Метил-(3,5-ди-иод)- и метил-(<i>n</i> -гидрокси)-бензимидазы (реагент Вудса) 2-Иминотиолаи (реагент Траута) <i>o</i> -Фталевый альдегид		pH 8,0—9,0, 25—37 °C, мкМ; степень модификации со временем растет Отдает свободные тиольные группы, поэтому может использоваться как перекрестносшивающий реагент. pH 8,0, мМ, 4—25 °C, 1 ч pH 9,0—10,5, до 10 мМ, 10—50 °C, до 10 мин, для образования флуорофора требуется 2-меркаптоэтанол	[9] [10] [12]
Серин/ Треонин	Уксусный/Янтарный ангидриды		Не селективны	[13]
Триптофан		Ангидрид этоксиуравьиной кислоты	Реагирует также с His, Lys, Ser и Tyr	[14]
Тирозин		<i>n</i> -Нитробензол-сульфонил-хлорид	pH 7—8, 25 °C, 1 мМ, 30 мин	[15]

Литература

1. Yankeelov J. A. Jr. (1972). *Methods Enzymol.*, 25, 566.
2. Pande C. S., Pelzig M., Glass J. D. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 896.
3. Patthy L., Smith E. L. (1975). *J. Biol. Chem.*, 250, 557.

4. *Yamasaki R. B., Shimer D. A., Feeney R. E. (1981). Analyt. Biochem., 111, 220.*
5. *Soby L. M., Johnson P. (1981). Analyt. Biochem., 113, 149.*
6. *Riddles P. W., Blakeley R. L., Zerner B. (1979). Analyt. Biochem., 94, 75.*
7. *Schwartz W. E., Smith P. K., Royer G. P. (1980). Analyt. Biochem., 106., 43.*
8. *Andrews J. L., Ternal B., Whitehouse M. W. (1982). Arch. Biochem. Biophys., 214, 386.*
9. *Bright G. R., Spooner B. S. (1983). Analyt. Biochem., 131, 301.*
10. *Birnbaumer M. E., Sehrader W. T., O'Malley B. W. (1979). Biochem. J., 181, 201.*
11. *Lambert J. M., Baileau G., Cover J. A., Traut R. R. (1983). Biochemistry, 22, 3913.*
12. *Benson J. R., Hare P. E. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 619.*
13. *Aken G., Harris J. I. (1976). Eur. J. Biochem., 62, 601.*
14. *Tsurushiin S., Hirawatsu A., Inamatsu M., Yasunolsu K. T. (1975). Biochim. Biophys. Acta, 400, 451.*
15. *Liao T.-H., Ting R. S., Yeung J. E. (1982). J. Biol. Chem., 257, 5637.*

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ СО СДВИГОМ ЗАРЯДА

Интегральные мембранные белки, по-видимому, содержат протяженные гидрофобные участки, которые облегчают их встраивание в липидный бислой. При солиubilизации в неденатурирующих условиях с этими участками связывается детергент, и эта особенность используется при электрофорезе со сдвигом заряда. Поскольку детергенты могут быть нейтральными, положительно или отрицательно заряженными, их связывание может приводить к изменению заряда белка и соответственно его электрофоретической подвижности. Способность детергентов изменять электрофоретическую подвижность белков можно использовать для того, чтобы установить, действительно ли данный белок содержит протяженные гидрофобные участки и можно ли считать его типичным мембранным интегральным белком. Мы опишем достаточно простую методику, которую можно использовать в сочетании с иммуноэлектрофорезом. Единственное препятствие для ее применения — склонность белка к агрегации в различных детергентах.

Методика

1. Готовят гели на стеклянных пластинках (10 или 20×20 см), используя 1%-ную агарозу в буфере, содержащем 37,5 мМ трис, 100 мМ глицин (рН 8,7) и 0,5-1% детергента. К нейтральным детергентам относятся тритон X-100, октилглюкозид, луброл, эмульгоген BC720 (наиболее пригоден для данной методики) и дигитонин; к положительно заряженным детергентам относятся ЦТАБ (наиболее пригоден для данной методики) и ДТАБ; среди отрицательно заряженных детергентов наиболее подходящим является дезоксихолат. Заряженные детергенты обычно используют в смеси с нейтральными детергентами (в соотношении от 1:1 до 1:10).

2. Помещают пластины в камеру для электрофореза (если это возможно, то лучше охлаждать ее водой), содержащую со-

ответствующий буфер. Соединяют гель с буфером посредством бумажных фитилей.

3. Проводят предварительный электрофорез в течение 15—20 мин при 4—5 В/см.

4. Наносят образцы (10—15 мкл раствора, содержащего 10—20 мкг белка и детергент в концентрации до 5%) в лунки (1×10 мм), вырезанные в геле. Стартовая зона должна находиться примерно на равном расстоянии от ближайших фитилей, особенно если белок слабо заряжен.

5. Проводят электрофорез в течение 2—3 ч при 4—5 В/см.

6. Снимают гель, подсушивают его в потоке теплого воздуха (при этом может понадобиться закрепить гель), окрашивают белок с помощью раствора, содержащего 0,1% кумасси синего, 40% метанола и 7% уксусной кислоты, в течение 1—3 ч и затем отмывают гель в том же растворе, не содержащем красителя.

7. Белки, связывающие ДОХ и ЦТАБ, должны располагаться ближе к аноду и катоду соответственно по сравнению с их положением в нейтральном детергенте, таком, например, как тритон.

Этот метод особенно информативен в сочетании с перекрестным иммуноэлектрофорезом. При этом электрофорез со сдвигом заряда проводят вдоль одного края квадратной стеклянной пластинки, как описано ранее. Затем участок агарозы выше образца удаляют и заменяют агарозой, содержащей соответствующее антитело и нейтральный детергент. После электрофореза во втором направлении, проведенного в условиях, подходящих для перекрестного иммуноэлектрофореза, образуются полосы преципитации, что позволяет легко выявить сдвиг заряда изучаемого белка.

Литература

1. *Helenius A., Simons K. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 529.*
2. *Norrild B., Bjerrum D. J., Vestergaard P. F. (1977). Anal. Biochem., 81, 432.*
3. *Bjerrum O. J. (ed.) (1983). Immuno-electrophoretic Analysis of Membrane Proteins. Elsevier, Amsterdam.*
4. *Booth A. G., Hubbard L. M. L., Kenny A. J. (1979). Biochem. J., 179, 397.*

АНАЛИЗ ИНОЗИТОЛФОСФАТОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ

В последнее время благодаря усовершенствованию методов анализа инозитолфосфатов удалось в значительной мере понять их биологическую роль. Инозитол-1,4,5-трисфосфат, образующийся из фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (рис. 4.6), является вторичным посредником, основная функция которого состоит в мобилизации ионов кальция из эндоплазматического ретикулума. Кроме того, инозитол-1,4,5-трисфосфат фосфорилируется киназой с образованием инозитол-1,3,4,5-тетраakisфосфата, который, по-видимому, играет роль еще одного вторичного посредника и действует на плазматическую мембрану, изменяя транспорт кальция [1, 2].

Анализ инозитолфосфатов удалось существенно упростить с развитием метода ВЭЖХ [3—6]. В этом случае инозитолсодержащие фосфолипиды предварительно метят [^{32}P]- или [^3H]-инозитолом и за образованием меченых инозитолфосфатов следят с помощью ВЭЖХ, используя сцинтилляционный счетчик и/или УФ-денситометр. Если инозитолфосфаты образуются в очень небольших количествах, единственный способ их определения состоит в идентификации пиков радиоактивного материала, элюируемого с ВЭЖХ-колонок, и соотношении их с положением пиков стандартных образцов. В связи с этим очень важно убедиться в том, что меченый материал не является примесями, содержащимися в исследуемой системе.

После стимуляции клеток или ткани ферментативные реакции останавливают добавлением трихлоруксусной кислоты до концентрации 10%. Полученные образцы можно анализировать, как описано в разд. 3.3 гл. 4, или методом ВЭЖХ (см. ниже).

1. Нейтрализуют образец с помощью трис-основания.
2. Добавляют 100 мкл 50 мМ маннитола, чтобы облегчить извлечение инозитолфосфатов.
3. Высушивают образец лиофилизацией и затем растворяют его в 2 мл 1 М ЭДТА, pH 7,0, или в дистиллированной воде.
4. Наносят его на колонку ВЭЖХ с анионитом Whatman Partisil 10 SAX.

Инозитолфосфаты вымываются раствором формиата аммония, рН которого доведен до 3,7 фосфорной кислотой. Фосфат необходим для улучшения разделения пиков [3]. Инозитолфосфат, инозитол-1,4-бисфосфат, инозитол-1,3,4-трисфосфат и инозитол-1,4,5-трисфосфат элюируются последовательно градиентом 100% воды — 100% 1 М или 0,85 М аммонийформиат/фосфатного буфера [3, 4, 6]. Чтобы разделить высшие инозитолфосфаты, включая инозитол-1,3,4,5-тетраakisфосфат, после элюирования 0—1 М аммонийформиат/фосфатом проводят второе элюирование более крутым градиентом аммонийформиат/фосфата, 1 М — 1,7 М [6] или 0,85 М — 3,4 М [5]. Для калибровки колонок следует использовать стандартные образцы инозитолфосфатов. В качестве маркеров лучше всего подходят АМР, АДФ или АТР; их необходимо использовать, чтобы убедиться в воспроизводимости разделительной способности колонки.

Литература

1. Irvine R. F., Moore R. M. (1986). *Biochem. J.*, **240**, 917.
2. Irvine R. F., Letcher A. J., Heslop J. P., Berridge M. J. (1986). *Nature*, **320**, 631.
3. Irvine R. F., Anggard E. A., Letcher A. J., Downes C. P. (1985). *Biochem. J.*, **229**, 505.
4. Heslop J. P., Irvine R. F., Tashjian A., Berridge M. J. (1985). *J. Exp. Biol.*, **119**, 395.
5. Burgess G. M., McKinney J. S., Irvine R. F., Putney J. W. (1985). *Biochem. J.*, **232**, 237.
6. Tennes K. A., McKinney J. S., Putney J. W. (1987). *Biochem. J.*, **242**, 797.

- А**
Авидность 110, 128, 132, 133
Аденилатциклаза 206, 237, 394
S-аденозилметионин 193
**Адсорбция необратимая на хромато-
 графических носителях** 256, 257
Адьювант Фрейнда 112
Азолектин 210, 225
Азолектиновые везикулы 225, 247
Актин 14
**Альбумин бычий сывороточный галак-
 тозилированный** 30, 32
Амилопласты 63
 — выделение 97—98
 — ферменты-маркеры 75, 98
9-аминоакридин 328, 331, 335
Аминоакридиновые красители 318
Аминофосфолипиды 186
Амфифильное вещество 232
Амфифильные молекулы 198, 206, 246
Амфифильный хромофор 335
Амфолиты, удаление 261
**1-анилино-8-нафталинсульфонат
 (АНС)** 335
Анкирин, электронная микроскопия
 346, 349
**Антиген — антитело, разрушение свя-
 зи** 138
Антиген группы крови А 140
Антигенные свойства 111
Антигены 110—111, 117, 119, 126, 127,
 128, 138
 — липидные 112
 — мембранные 122
 — Н-2 14
Антисыворотки поликлональные 110,
 111
Антитела в качестве зондов 142
 — к ферментам, скрининг 119, 121—
 123
 — моноклональные 109, 110, 112—
 120, 126, 130, 132, 137, 139, 140
 — — получение 112—113, 114—117
 — — скрининг 113, 117, 119—123
 — — трансмембранная ориентация
 белка 228
 — поликлональные 109, 111, 129, 130,
 145
 — — против органелл 128—129
Аппарат Гольджи 13, 22, 24, 33, 35, 38,
 40, 41, 45—47, 63, 66, 68, 75, 76, 78,
 79, 81, 82, 92, 93—94, 178, 182, 183
 — из печени крысы 41, 160
 — — — выделение 45—47
 — — источники получения 54
 — — негативное контрастирование
 83
 — — секреторные везикулы 93—94
 — — субфракционирование 46—47
 — — ферментные маркеры 394
Арилсульфатаза 394
**Артефакты при флуоресцентных из-
 мерениях** 315—319
Аутофагические вакуоли 44, 54
 **β -N-ацетилглюкозаминилфосфотранс-
 фераза** 46—47
**Ацетилхолиновый рецептор см. Ре-
 цептор ацетилхолиновый**
 Ca^{2+} -АТРаза, реконструкция 230
 — саркоплазматического ретикулума
 383
 Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, реконструкция
 216
 **Mg^{2+} -АТРаза, активируемая моненси-
 ном** 50, 394
 — ингибируемая ванадатом 84
 — — нитратами 75, 79, 86
 $\text{Na}^{+} + \text{K}^{+}$ -АТРаза 394
 — из ректальной железы акулы 377
Бактериородопсин 231, 239, 246, 255,
 350, 351, 366
Бактериохлорофилл 325
Белки, агрегация 256, 403
 — вращательная диффузия 365—369

- гидродинамические методы 346, 348
- дисперсия оптического вращения (ДОВ) 350
- инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния 352—353
- каналобразующие 254
- клеточные поверхностные, ковалентно пришитые радиоактивные метки 52, 396—397
- конформация полипептидных цепей 348—353
- коэффициент трения 346, 348
- круговой дихроизм (КД) 350, 352
- латеральная диффузия 370—371
- липидпереносящие (ЛПБ) *см.* Белки фосфолипидобменивающие
- мембранные, аминокислотная последовательность 141
- векторная трансмембранная ориентация 229, 230, 231
- — взаимодействие между лигандом и рецептором 299—301
- дифракционные методы 246—247
- — извлечение из геля 271—273
- — иммунологический анализ 123, 126
- — интегральные 196, 251, 252—256, 257, 261, 339, 341, 348, 366, 381, 382, 403
- — — агрегация 275
- — — иодирование 280—281, 285—287
- — — ионные каналы 196
- — — кристаллизация 246—247
- — критерии реконструкции 197
- — модификация ковалентная 279—287
- — — сшивающими агентами 291—301
- — — фоточувствительными гидрофобными реагентами 285, 288—289, 290
- — — определение ферментативной активности 232, 237—238
- — — очистка и характеристика 196
- — — на иммуносорбентах 137—141
- — — периферические 251, 252, 253, 256, 339, 341, 381, 382
- — — радиационная инаktivация, определение молекулярной массы 301—302, 344
- — — расщепление 275—276
- — — реконструкция, общие методы 214—218
- — — с помощью ультразвука 217—218
- — — трансмембранная ориентация 229—231
- — — связывание лигандов 232—239, 396, 398
- — — — гель-фильтрация 233
- — — — иммунологические методы 233
- — — — осаждение полиэтиленгликолем 233, 398
- — — — диализ проточный 233
- — — — равновесный 233
- — — — фильтрование 233, 234, 235
- — — система растворителей FACE 255, 258, 261, 273
- — — солюбилизация 134—137, 198—214
- — — солюбилизованные, стабильность, влияние липидов 209—210
- — — — параметр ρ 208—209
- — — — электроолюция с диализом 273, 274
- — — модифицирующие реагенты 400—401
- — — молекулярные размеры 344—348
- — — окрашивание 124, 125
- — — определение концентрации, методы 277—279
- — — — по методу Брэдфорд 22, 278
- — — — — Лоури 22
- — — — — микрометоду Лоури 277, 279
- — — — реакция с нингидрином 278, 279
- — — — флуорескамин 277
- — — молекулярной массы 340—344
- — — подвижность участков молекулы 353
- — — радиус инерции 345
- — — секретрируемые 178, 182
- — — β -слои 352
- — — α -спирали 350, 351, 352, 353
- — — трансмембранные 134
- — — трехмерная структура 348—349
- — — фосфолипидобменивающие (фосфолипидного обмена) 177, 188—192, 375
- — — трансмембранное распределение фосфолипидов 177, 188—192
- — — химическое сшивание 340—341
- Белково-липидные взаимодействия, характеристика 376—382
- Белок порин, кристаллы 348
- ретинолсвязывающий (РСБ) из плазмы крови 397

- M13, реконструкция 230
- G₂-белок, взаимодействие с β -адрен-
эргическим рецептором 237, 238
- Бислой липидный 251
- Бромацетилхолин 213
- α -Бунгаротоксин, связывание с аце-
тилхолиновым рецептором 234, 236
- Вакуоли** 54, 62—63
 - из растительных тканей 86
 - источники получения 54
- Валиномицин 319, 324, 327, 328, 329,
374
- Везикулы димиристонлфосфатидилхо-
линовые 230
 - желчных канальцев 18
 - замкнутые 374, 375
 - — непроницаемые, морфологиче-
ская ориентация 177, 182
 - — проницаемые, разделение 87
 - мембранные 49, 179, 181, 182, 184,
186, 192
 - мембраны щеточной каемки 18, 41
 - микросомные 178, 179, 180, 182,
188
 - — ориентация 178
 - многослойные 226
 - мономембранные 214, 218, 225
 - окаймленные 19, 21, 35, 39, 40, 47—
49, 68, 75. См. также Везикулы, по-
крытые клатрином
 - — выделение из плаценты челове-
ка 48, 49
 - — — протопластов 102
 - покрытые клатрином 134
 - правильно ориентированные и вы-
вернутые 35, 134
 - реконструированные, измерение
внутреннего объема 226—227
 - — — проницаемости 227
 - — трансмембранная ориентация
белка 227—231
 - секреторные 30, 41, 93—94
 - синаптические 35
 - щеточной каемки кишечника 35
 - эндцитозные 26, 30—31
- Вектор плазмидный рEX 142, 143
 - фаговый λ gt11 142—143
- Вератридин, связывание с натриевым
каналом 245
- Вирус леса Семлики, трансмембран-
ная ориентация белка 230
 - Сендай, нидукция проницаемости
клеток 335
- Время вращательной корреляции 364,
367
- β -Галактозидаза 142, 143
- Галактозилтрансфераза 28, 40, 46,
182, 394
- Галактозооксидаза 287
- Галактолипиды, биосинтез 98, 99
- Ганглиозиды 165, 171
 - окрашивание после ТСХ 171
- Гель-фильтрация 136, 138, 141, 198,
270—271, 272, 398
 - определение радиуса Стокса 343—
344
 - — размеров реконструированных
везикул 221
 - удаление детергента 216, 225, 238
- Гемагглютнин вируса гриппа (HA1)
111
- Гемоглобин 320, 321, 322
- Гемопротенины 319, 320
- Гепатома 14
- Гепатоциты 14
- Гибридные клетки 113
- Гибридомы 115, 130
- Гидродинамические методы 346, 348
 - — число Перрена F 346, 348
- Гидроксиплапатит 398
- Гипокотили тыквы этилированные,
фракционирование гомогената 70
- Гликозид дарин цианогенный 86
- Гликолипиды 255
 - окрашивание после ТСХ 171
- Гликопротеины, аффинная хромато-
графия 268—269
- Глисосомы 24
- Гликофорин 222, 227, 255
 - реконструкция 230
- Глиоксисомы 101
- Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
NADP-зависимая 95
- Глицерол, градиенты плотности 41, 88
- Глутаматсинтаза 98
- γ -Глутамилтранспептидаза 394
- Глутаровый альдегид, стабилизация
органелл 66
- Глюкансинтаза I 70, 79, 102
 - II 70, 76, 77, 79, 84
- β -Глюкансинтаза 93—94
- Глюкозооксидаза 281
- Глюкозо-6-фосфатаза 40, 42, 45, 179,
394
- Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 98
- Глюконат-6-фосфатаза, отсутствие у
растений 92
- β -Глюкуронидаза 394
- Гомогенат, стабилизация 65—66
- Гомогенизатор Даунса 16, 17, 18, 42,
44, 102
 - политрон 64—65

- Поттера — Элвехейма 16, 43
- Уоринга 96
- Гомогенизация с помощью бритвенного лезвия 64, 65, 98, 99, 101
- — — ультразвука 18, 42, 97, 99, 190
- Гуанидингидрохлорид 273
- Гуанилатциклаза 216—217
- Декстран 22, 32, 33, 34, 83, 85, 87
- Десмосомы 54, 55
- Детергенты, выделение комплексов межклеточных контактов 52, 55
- дезоксихолат 183, 238, 270, 381
- дигитонин 201, 203, 205, 210, 238, 239
- додецилтриметиламмонийбромид 270
- — — нонные 202, 205, 207
- использование при центрифугировании 341
- — — электрофорезе 270—271
- критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) 135, 206—208
- лизолецитин 183
- луброл 238, 403
- меченые, коммерческие препараты 207
- неионные 202, 205, 207
- нонидет P40 398
- полиоксизтиленовые 205, 206
- свойства 135, 206
- таурохолат 179, 180, 183
- тритон X-100 270, 403
- — X-114 253
- тритоны 202, 203, 205, 206, 207, 208
- удаление 215, 225
- — из смешанных мицелл 215
- физико-химические свойства 202—206
- холамидопропилдиметиламмоний-1 пропансульфонат (CHAPS) 262
- холат 238
- Диазоцеллюлоза, приготовление 118—119
- Диаминобензидин (ДАБ) 30, 31, 32
- Диацилглицерол 150
- Дибутилфталат 327, 397, 398
- Дигалактозилдиацилглицерол 97
- Дигидроальprenолол, связывание с β -адренэргическим рецептором 237, 238
- Дигитонин, связывание с холестерином 27—29
- Дниоддиазобензолсульфонат (ДДИС), иодирование аминокислот 286
- Дниодсалицилат 252
- Дилаурилглицеролфосфохолин 14
- Динитрофторбензол 186
- Дионилфталат 327, 397
- Днолеилфосфатидилхолин (ДОФХ), реконструкция мембран 223
- Дисперсия оптического вращения (ДОВ) 350
- Дифенилгексатриен, аннизотропия флуоресценции 384
- Дифракция нейтронов на кристаллах белков 349
- — и рентгеновских лучей, липиды 355, 356—359, 361
- Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), фазовые переходы 354, 355
- Диффузия вращательная белков и липидов 365—370
- латеральная белков 370—371
- — липидов 371—373
- Диэлаидоилфосфатидилхолин (ДЭФХ), морфология реконструированных мембран 224
- ДНК комплементарная (кДНК), гибрид-селективная трансакция 141
- — скрининг 142, 143, 144
- — — с помощью зондов 141
- Дофамин- β -монооксигеназа 206
- Жирные кислоты, определение 176—177
- транс-гош*-Изомеризация 359, 364, 369
- Изоэлектрическое фокусирование 83, 260—261
- — электрофорез в формирующем-градиенте pH (метод NEPHGE) 260—261
- Иммортализация клеток 111, 112
- Иммунизация животных 111—112, 114
- Иммуноаффинная очистка антител 126
- — мембранных белков 137—141
- — прямые и непрямые методы 37—38, 128—129
- — субклеточных фракций 127—134
- Иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг) 123—126
- колоний 143—145
- Иммуногенность 110
- Иммуногены 110, 112
- Иммуноглобулины класса G 117, 130
- Иммунопероксидазное окрашивание белков 124—125

- Иммуносорбенты 117, 118—119, 128, 129, 130, 131, 132, 134, 137—139
— емкость связывания 131—132
— условия элюции белков 138—141
— целлюлозные 117, 118—119, 132
Иммуоферментные определения 123
Иммуоэлектрофорез 403
Индикаторные красители, измерение внутриклеточного pH, нейтральный красный 333—335
— — — концентрации ионов кальция, квин-2 331, 333
— — — pH, квен-1 331, 333
Инозиндифосфатаза латентная 82
Инозитолтрифосфат 150, 165, 166
Инозитолфосфаты, анализ методом ВЭЖХ 405—406
— разделение и анализ 167—169
Иодгидроксibenилпидолол, связывание с β -адренэргическим рецептором 237
Иодоген, иодирование белков 285
Ионные каналы, функциональная активность 196, 221—222, 227, 229
Ионный транспорт, измерение быстрой кинетики 241
— — — — тушение флуоресценции 243
IDPaза латентная 79, 93

Кавитация газов, использование для разрушения клеток 17
Каналы кальциевые 238—239
— натриевые 227, 245
— потенциалзависимые 245
Карбонилцианид-*п*-трифторметоксифенилгидразон (ФКФ) 319, 328, 329
Кардиолипиды 40, 163
Карнитинпальмитилтрансфераза 394
Каротиноидные пигменты 313, 324
Каротиноиды 70, 75, 79, 97, 98
Карты электронной плотности 348
Каталаза 45, 75, 79, 101, 102, 394
Кинурунин-3-гидроксилаза 394
Клатрин 40, 47, 102, 134
Клатриновые «корзинки» 43
Клетки асцитной опухоли линии Леттре 326, 333, 334
— — — — измерение pH 333—334
Клеточный компонент, определение 66
— — — распределение в цитоплазме 81, 394
Клонирование кДНК 142
— клеток 115—116
Кокосовое молоко, стабилизация компонентов гомогената 65, 71

Колицин Ia 216
Колхицин 14
Комплекс антиген — антитело 138
— железо — сорбитол — лимонная кислота, метод выделения лизосом 43
— рецептор — лиганд 398
Контакты (соединения) межклеточные 52, 54, 55
— щелевые 19, 54, 55
Коэффициент диффузии 370—371, 372, 373
— (показатель) преломления 26, 390, 392
Кристаллография нейтронная 349
Круговой дихроизм (КД), конформация мембранных белков 350, 352
Кураге, ингибирование захвата ионов везикулами 240

Лактатдегидрогеназа 181—182, 394
Лактопероксидаза 281
N-лаурилсаркозинат 33
Лейкоциты 15, 35
Лейцинаминопептидаза 394
Лектины, аффинная хроматография 268—269
Лиганд, взаимодействия с рецептором 299—301, 396—399
Лизосомы, выделение 24, 26—27
— — — из почек 25—26
— — — и очистка 43
— — — с использованием коллоидного золота 43
— — — комплекса железо — сорбитол — лимонная кислота 43
— — — из клеток в культуре 35, 44
— — — печени крысы 35, 43—44
— источники получения 54
— как ферментные маркеры 44, 394
Лизофосфолипиды 160, 163, 164, 184
Липидный бислой 383
— монослой 381
Липиды аминоксодержащие, окрашивание после ТСХ 170
— аннулярные 377, 378, 379, 383, 384
— дифференциальный термический анализ (ДТА) 354
— мембранные, асимметричное распределение 150
— — асимметрия бислоя 383, 385
— — бислой 150
— — включение радиоактивных предшественников 153
— — влияние белка на их структуру и подвижность 383—385
— — гексагональная фаза 384

- домены гексагональной фазы 384
- — концентрирование экстракта 154—156
- — латеральная диффузия 371—373
- — неполярные 160, 163
- — перекисное окисление 152
- — подвижность углеводородных «хвостов» 363—365
- — полярные 160
- — разделение по классам 156—169
- — реакция клеток на внешние стимулы 150
- — системы растворителей 160—165, 166—167, 168
- — трансмембранное распределение 177—192
- — упорядоченность и низкочастотная подвижность фосфолипидов 384
- — флип-флоп-переходы 373—376
- — экстракция 151—156, 254—256
- — смесью хлороформ/метанол 152, 153, 154
- — удаление растворителя 154—156
- морфология реконструированных мембран 224—225
- окрашивание после ТСХ 169—171
- определение сложных эфиров 174—175
- разделение фаз и доменная структура 361—363
- фазовое разделение 384
- фазовые переходы 354, 355
- флуоресцентная спектроскопия 356, 362—363, 382
- холинсодержащие, окрашивание после ТСХ 170—171
- электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) 356, 362
- элюирование 171—172
- ядерный магнитный резонанс (ЯМР) 355, 359—360, 364
- Липосомы 216, 217, 221
- приготовление 190—192
- Маленимиднитроксид как спиновая метка 368
- Маннозидазы 46, 86
- Маннозилтрансфераза 28, 91
- Маннозо-6-фосфатаза, определение активности 179—180
- — проницаемости микросомной мембраны 179, 182
- Маркеры абсолютные 74
- субклеточные, критерии их использования 39—40
- — определение 38, 67
- субклеточных фракций 79, 394
- условные 76
- химические 38, 40—41
- Мастоцитомы 14
- Мембранный потенциал, измерение 323—328, 329
- — клеток Леттре 326
- — лимфоцитов 329
- — хроматофоров 324
- Мембраны акцепторные 189
- вируса леса Семлики, агрегация белка при реконструкции 230
- донорные 188, 189
- жидкомозаичная модель структуры 196
- из электрических органов *Torpedo californica* 211
- — микросомные, проницаемость 178—181
- — сохранение структурной организации 182
- модификация, реагенты амфифильные 289—291
- — — химические 282—284
- органелл, ориентация 178
- плазматические 51—52, 53
- — асимметричная организация 52
- — везикулы тонопласта 68
- — доменная организация 38, 51, 52
- — из желчных канальцев 33
- — растительных клеток, выделение 83—85
- — стеблей растений, выделение в градиентах сахарозы и глицерола 87—88
- — источники получения 24, 53
- — ковалентно пришитые радиоактивные метки 52
- — латеральные домены 52
- — маркеры 38, 40, 70, 74, 75, 76—80, 84—85, 394
- — разделение в двухфазной системе 32—34
- — связывание фосфовольфрамовой кислоты (ФВК) 74, 75, 77, 82
- — транспорт ионов и молекул 52
- — экстракция NaOH 55
- — электрофорез 35—37
- — поверхностный потенциал 335—336
- протилакоидные 63
- реконструированные, отношение липид/белок 222
- толщина 74, 76
- экстракция гуанидинийхлоридом 252
- — мочевиной 252

- — разбавленными кислотами и щелочами 252
- — щелочная 46, 47, 55, 183
- эритроцитов, нормальная и обратная ориентация 178
- ядерные 41—42, 54, 76, 81, 100
- Метризамид, градиенты плотности 23, 43, 44, 68, 391
- Миелома, клетки 113, 114
- Микровезикулы 14
- Микроскопия криоэлектронная, реконструкция мембран 219, 221
- флуоресцентная, образование доменов в липидных молекулах 363
- электронная *см.* Электронная микроскопия
- Микросомы 178, 179, 180, 181, 183, 190, 191, 192
- включение меченых предшественников липидов 188—189, 190—192
- Микротельца из растений 81, 101—102
- Мнобласти 14
- Митохондрии 24, 29, 35, 63, 66, 68, 75, 76, 79, 81, 82
- выделение 42
- — из жировых клеток 25
- — растительных гомогенатов 89—91
- из печени крысы 35
- и синапсомы, разделение в двухфазной системе 29, 33
- источники получения 24, 54
- окислительно-восстановительное состояние 316—317, 319, 320, 321—322
- пигменты дыхательной цепи 320—322
- поглощение цианиновых красителей 318
- субфракционирование на наружные и внутренние мембраны 42—43, 90—91
- ферментные маркеры 75, 394
- флуоресценция пиридиннуклеотидов 317
- — флавопротеинов 317, 319
- Мицеллообразование, критическая концентрация (ККМ) 256
- Мицеллы 200, 206
- Моненсин 50, 328
- Моноаминоксидаза как ферментный маркер 43, 90, 394
- Моногалактозилдиглицерид 75, 79
- Монохроматор 310, 311
- Морфометрия 77, 81—82, 97
- этилированные гипокотили сои 78, 79, 81
- Найкоденз, градиенты плотности 23, 24, 27, 43, 52, 391, 392
- N-1-нафтилфаламовая кислота (НФК), связывание плазматической мембраной 84
- Нейраминидаза 228, 269, 287
- Нейтронное рассеяние, фазовые переходы 355
- Нитратредуктаза 98
- Нитрендипин 239
- Нуклеозиддифосфатаза 70
- Нуклеозидтрифосфатазы как маркеры ядерных оболочек 42
- 5'-нуклеотидаза 28, 121, 137, 394
- Оксигемоглобин 320, 321
- Оксидаза α -гидроксикислот 45
- Оксонол 309, 325, 326, 329
- Органелла как термин 66
- транс*-Паринаровая кислота, образование доменов в бислое 362
- Перилен, деполяризация флуоресценции 365
- Перколл, градиенты плотности 22—23, 24, 43, 45, 52, 68, 90, 95, 96, 391
- Пероксидаза 102
- хрена 30—31, 32
- Пероксисомы 23, 24, 26, 27, 44—45, 63, 68, 75, 101, 294
- выделение 23, 44—45
- источники получения 54
- Пирендекановая кислота, образование эксимеров 363
- Пластиды 63, 94—99
- Пластоглобулы 99
- Поликлональные антитела, получение 111—112. *См. также* Антитела поликлональные
- разделение 165—167
- Полифосфонозитиды, гидролиз 150
- тонкослойная хроматография 166—167
- хроматография на бумаге 168
- Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 32—34, 83, 85, 398
- Проламеллярные тела 97
- Проницаемость мембраны, методы регистрации 239
- Пропластиды (препластиды) 63
- Протеазы, ингибиторы 19, 20—21, 253
- — классификация 20—21
- — тетрагидрат натрия 21, 253
- — фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) 19, 20, 211, 253
- расщепление мембранных белков 275—276

- трипсин 37
- Протеолипидные белки миелина, экстракция 255
- Противоточное распределение 33
- Радиационная инаktivация, определение молекулярной массы белков 301—302, 344
- Разделение в водной двухфазной системе с двумя полимерами 32—34, 69, 71, 72, 83, 85, 95
- Рассеяние малоугловое нейтронов, определение молекулярной массы и размеров макромолекул 342, 345
- рентгеновских лучей, определение молекулярной массы и размеров макромолекул 342, 345
- Реконструкция мембран, холатный диализ 223, 224, 226
- Ренографин, градиенты плотности 68, 87
- Рентгеновская дифракция на кристаллах белков 348—349
- Рентгеновское рассеяние, фазовые переходы 355
- Рентгеноструктурный анализ кристаллов 348
- Ретикулоциты 14
- Рецептор β -адренэргический 211, 237—238
- регуляция активности аденилатциклазы 237
- асиалогликопротеиновый 216, 394
- ацетилхолиновый 209, 210, 229, 234. *См. также* Рецептор никотиновый
- десенситизация 240
- иммунопреципитация 228
- очистка с помощью аффинной хроматографии 212—213
- реконструкция 222, 224, 225, 229, 231
- влияние замораживания — оттаивания 225—226
- связывание с α -бунгаротоксином 234—236
- карбамилхолином 235
- флуоресцентными аналитами ацетилхолина 237
- солюбилизация и очистка 212—214
- транспортная активность 240—245
- электронные микрофотографии 220, 226
- никотиновый ацетилхолиновый из электрических органов ската *Torpedo californica* 197, 213
- Рецепторы мембраносвязанные, комплексы с лигандами 396—398
- никотиновые холинэргические 34
- опиатные 34
- солюбилизованные, комплексы рецептор — лиганд 398—399
- трансферрина 14, 30—31
- фактора роста эпидермиса 14, 19
- Рибосомы, отделение от эндоплазматического ретикула 92
- Рибулозодифосфаткарбоксилаза 95
- Родопсин 255, 366
- реконструкция 216, 224, 229
- Саркоплазматический ретикулум, электронная плотность мембраны 347
- Сахароза, градиенты плотности 21, 26—27, 69, 87, 88, 390, 391
- Светорассеяние, определение молекулярной массы макромолекул 342
- Сефалекс LN 256, 258, 261, 264, 273
- Сефакрил 35, 43
- Сефароза, октил- и фенилпроизводные 261, 262
- хроматография 137, 227, 256
- Сиалитрансфераза 46, 394
- Сиаловая кислота 40, 228, 269, 287
- Силикон коллоидный, выделение плазматических мембран 15
- Синапсомы 24, 29
- из мозга животных 33
- холинэргические 133—134
- Солюбилизация, критерии 135—137, 198—201
- мембранных белков, метод ^{31}P -ЯМР 199—200
- Спектрин 14, 346, 349, 380, 382
- производные, спектры флуоресценции 380
- Спектроскопические исследования биологических объектов 310—311
- Спектроскопия инфракрасная (ИК-спектроскопия) 352—353, 356, 381
- комбинационного рассеяния 352—353, 356, 381
- низкотемпературная 319—320
- оптическая триплетных зондов 366—367
- флуоресцентная корреляционная 373
- липиды 356, 362—363, 382
- Спектрофотометры 310, 311
- сканирующие двухволновые 322—323

- Спиновые метки липидов 356, 361, 362, 365, 369
Спин-спиновое взаимодействие 362
Спленоциты 113, 115
Среда ГАТ 113, 114, 115
Стероиды мембранные 385
Сукцинат-INT-редуктаза 79, 81
Супероза, адсорбция белков 258, 262
Сшивающие бифункциональные реагенты 291—297
- Таллий, ионы 245
Таннины 63
Тилакоидные везикулы 96
Тилакоиды 75, 76, 95—96
Токсины, связывание с белками 234, 236, 245
Тонoplastы 62, 63, 73, 74, 75
— везикулы с транспортной активностью 87
— выделение 85—86, 87—89
— — из стеблей растений в градиентах сахарозы и глицерола 87—88
— идентификация 85—86
— маркеры 74, 86
Трансглутаминаза 292
Транспортные функции мембраны, методы регистрации 239
Трансфераза, транспорт глюкозо-6-фосфата 179
Тринитробензолсульфокислота (ТНБС) 186, 187, 188
Громбоциты, разделение мембран 35—37
Г-трубочки 18, 29—30
- Углеводы мембранные, модификация 287—288
Ультразвук, гомогенизация 190
— разрушение клеток 18, 42, 97, 99
— реконструкция мембранных белков 217—218
Ультрацентрифугирование аналитическое, определение молекулярной массы макромолекул 341—342
Ультротель 137
- Фактор роста эпидермиса, рецептор 140—141
Фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) 271
Ферменты гликозилатного цикла 101
— β -окисления жирных кислот 101
Ферменты-маркеры 38, 40, 70, 75, 76, 77, 79—80, 90—91, 394
Феррицианид 95
- Ферроцитохромы, полосы поглощения 321
Фибробласты 14
Фиколл, градиенты плотности 39, 90, 99, 391, 392
Филиппин, связывание со стеролами 363, 385
Флуоресценция 314, 328, 330, 332
Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС) 373
Флуоресцентный микроскоп 312
— микрофотолиз (метод ФМ) 370
— — непрерывный (метод НФМ) 370, 372
Флуоресценция, анизотропия 361, 365, 384
— восстановление после обесцвечивания (метод ВФФ) 370, 371, 372, 373
— деполаризация 361, 365, 367
— клеток 312, 314
— синглет-синглетный перенос энергии 380
— тушение 243, 379, 380
Флуориметр 310, 311, 312
Флуориметрия биологических мембран, артефакты 315—319
Флуорофоров экзогенные 379
Фокусирование изоэлектрическое см. Изоэлектрическое фокусирование
Фосфатаза кислая 394
NADP-фосфатаза 394
Фосфатидилсерин 186
Фосфатидилхоллин 150, 165, 188, 189, 190, 191, 193
Фосфатидилэтаноламины 186, 189, 193
— метилирование 150, 157, 165
Фосфовольфрамовая кислота (ФВК) 74, 75, 77, 82
Фосфолипаза А 184, 185, 186
— С 184, 185
— D 184, 185
Фосфолипазы A_1 и A_2 184
Фосфолипидный бислой 182
Фосфолипиды 160, 163, 164, 169—170, 182
— включение меченых предшественников 189, 192—193, 194
— кислые 153
— — разделение 163—164
— окрашивание после ТСХ 169—170
— определение 172—174, 177—178
— фотоактивируемые аналоги 290
Фосфоресценция 366
Фотосинтезирующие бактерии, хромофоров 313, 324
Фотосинтетический реакционный центр 324, 348

- Фотоумножитель 310, 311
 Фоточувствительные модифицирующие реагенты 285, 288—289, 290, 299
 Фталатные эфиры алифатических спиртов, масляные среды 396

 Хаотропные агенты 252
 Химические модифицирующие реагенты, трансмембранное распределение фосфолипидов 177, 186—188
 Хлорамин Т, иодирование тирозина 286
 Хлоропласты 68, 74, 75, 94—96, 335
 — внутренняя и наружная мембраны 76, 96
 — выделение 94—95
 — — оболочек 96
 — субфракции 95—96
 — ферменты-маркеры 95
 Хлорофилл 75, 95
 — *a/b*, светособирающие комплексы 246, 247
 Холестерол 27—29, 40, 47, 160, 175—176, 225, 358, 369
 — определение 28, 175—176
 — — эфиров 175—176
 — связывание с дигитонином 27—29
 — эфиров 160, 175—176
 Холестерололеат, необмениваемый маркер 192
 CDP-холинцитидилтрансфераза 91
 Хроматин 41, 100
 Хроматография аффинная 264—270
 — — лиганды 265, 268—269
 — — носители 265, 266—267, 269, 270
 — — очистка ацетилхолинового рецептора 212—213
 — белков скоростная жидкостная (СЖХБ) 257, 258, 259, 262, 265
 — высокоэффективная жидкостная (ВЭЖХ) 156, 166, 257, 259, 260, 262, 265
 — — анализ инозитолфосфатов 405—406
 — газо-жидкостная (ГЖХ) 201
 — гидроксилпатит 259
 — гидрофобная 262—264
 — ионообменная 113, 166, 259—260
 — — на ДЭАЭ- и КМ-ионитах 259
 — на бумаге 166, 168
 — — колонке с дауэксом 167—168
 — проникающая (адсорбционная) 35
 — с обращенной фазой 262—264
 — — системы растворителей 263—264
 — тонкослойная (ТСХ) 156, 157—160, 161, 162—163, 164, 166—167, 169, 171
 — — двумерная 100, 161, 164—165, 185, 201
 Хроматофокусирование 261—262
 Хроматофоры фотосинтезирующих бактерий 313, 324
 — *Rhodobacter sphaeroides* 313, 324, 325
 Хромаффинные гранулы 24
 Хромопласты, источники и выделение 98—99
 Хроморофы, выбор 313
 — доставка к месту назначения 313—314
 — структура и функция биологических мембран 308, 309
 — токсическое действие 314—315
 — экзогенные 308, 309, 313
 — эндогенные 308, 313
 — — флуоресценция 314

 Цезия хлорид, градиент плотности 391
 Целлюлозная оболочка (стенка) растительной клетки 62
 Центрифугирование в градиенте плотности 21, 68—69
 — дифференциальное 67—68
 — зонально-скоростное 69
 — коэффициент седиментации 22
 — седиментационное равновесие белков 341—342, 343
 Цианиновые красители 313, 318
 Цитидиндифосфолинин 193
 Цитидиндифосфоэтаноламин 193
 Цитозоль как ферментный маркер 394
 Цитохалазин 14
 Цитохром *aa₃*, восстановление при ишемии 320
 — *b₅* 216
 — *c* 321
 Цитохромоксидаза 28, 70, 90, 228, 394
 — реконструкция 216
 NADH-цитохром *c* — редуктаза 70, 75
 NADPH-цитохром *c* — редуктаза 40, 75, 79, 91, 394

 Экспрессия 145
 Электронная микроскопия 346
 — — замораживание — скалывание 218, 219, 229, 363
 — — контрастирование с помощью фосфовольфрамовой кислоты (ФВК) 82, 83, 84
 — — лантан 85
 — — напыление 346
 — — негативное контрастирование

- 82—83, 218—219
— трансмембранная ориентация 182, 228—229
— — фиксация 82
Электронно-микроскопические исследования, количественный анализ 78—79, 82
Электронно-микроскопический анализ двумерных кристаллов 350
Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) 356, 361, 362, 365
— — — время вращательной релаксации 368
— — — спектры стеариновой кислоты 377
— — — с переносом насыщения 365, 366, 367—369
— — — — спектры для гемоглобина 368
— — — спин-меченных жирных кислот 361
— — — — липидов 362, 372, 374, 376—378
— — — фосфолипидов 365
Электрофорез в агарозных гелях 37, 39
— — ПААГ с ДСН 123, 124, 125, 126, 136, 270, 272, 297, 298, 302, 340
— высоковольтный в свободном потоке, получение препаратов клеточных компонентов 35, 71, 73, 77, 89
— со сдвигом заряда 135, 270, 403—404
Эндоплазматический ретикулум (ЭР) 68, 75, 76, 79, 81, 82
— — из печени крысы 41, 178
— — — растений, выделение 91
— — — идентификация 91—92
— — — отделение от рибосом 92
— — — ферменты-маркеры 91
— — обмен азотистыми основаниями 193
— — ферментные маркеры 75, 394
Эндосомы (эндоцитозные везикулы) 22, 27, 30, 31, 48, 49—51
— выделение из макрофагов 25
— измерение pH 328
— как ферментные маркеры 394
— кислые, накопление красителей 318
— поглощение 9-аминоакридина 328, 331
— — флуоресценция 328, 332
— с кислым содержимым 50, 313
Эндоцитоз, опосредованный рецепторами 31, 328
Энтероциты кролика 41
Эпитопы, анализ 123—126, 145
— картирование с помощью иммуноблоттинга 126
— классификация 110—111
Эпоксидгидролаза 394
Эритроциты 14
— мембраны, анионный переносчик 343, 367
— — флип-флоп-переходы 374
— тень, метод ВФФ 371
Эстеразы клеточные 331
— эндогенные 314
Этанолацилтрансфераза, определение активности 181
— целостность микросомных мембран 180—181
Этиопласты 63, 76, 79, 81
— внутренние мембраны 97
— выделение 96—97
— — проламеллярных тел 97
— — протилакоидов 97
— субфракционирование 97
Ядерная оболочка 76, 81
Ядерные мембраны 41—42, 54, 76, 81, 100
Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) 355, 359—360, 372—373, 374—376, 378—379, 384, 385
— — — время спин-решеточной релаксации 364
— — — спин-спиновой релаксации 364
— — — статическая упорядоченность 359
— — поровый комплекс 42, 100
Ядра 18, 27, 41—42, 63, 66, 68, 75, 99—100
Ядрышко 100

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	7
Список авторов	9
Список сокращений	11
Глава 1. Органеллы и мембраны животной клетки. У. Говард Эванс	13
1. Введение	13
2. Методы выделения	13
2.1. Недеструктивные методы	13
2.2. Методики, включающие разрушение клеток	17
3. Разделение субклеточных компонентов	19
3.1. Центрифугирование	19
3.2. Разделение в двухфазной системе, содержащей два полимера	32
3.3. Проникающая (адсорбционная) хроматография	35
3.4. Электрофорез	35
3.5. Иммуноаффинные методы	37
4. Идентификация и оценка чистоты субклеточных фракций	38
4.1. Определение ферментов-маркеров	38
4.2. Выбор маркеров и критерии их использования	39
5. Выделение различных органелл и мембранных систем	41
5.1. Ядра и ядерные мембраны	41
5.2. Митохондрии	42
5.3. Лизосомы	43
5.4. Пероксисомы	44
5.5. Аппарат Гольджи	45
5.6. Окаймленные везикулы	47
5.7. Эндосомы (эндоцитозные везикулы)	49
5.8. Плазматические мембраны	51
6. Заключение и перспективы	55
Литература	56
Глава 2. Мембранные фракции растительных клеток. Д. Джеймс Морре, Эндрю О'Брайман, Анна Стина Санделиус	62
1. Введение	62
2. Приготовление гомогената	64
2.1. Среда для гомогенизации	64
2.2. Методы гомогенизации	64
2.3. Удаление клеточных стенок и крупных обломков	65
2.4. Стабилизация гомогената	65
3. Основные подходы к разделению мембран	66

3.1. Дифференциальное центрифугирование и центрифугирование в градиенте плотности	67
3.2. Распределение в водных двухфазных системах	69
3.3. Препаративный электрофорез в свободном потоке	71
4. Идентификация клеточного компонента и критерии его очистки	73
5. Распределение маркеров и их выход	79
6. Морфология и морфометрия	81
6.1. Фиксация	82
6.2. Негативное контрастирование	82
7. Плазматическая мембрана и тонопласт	83
7.1. Маркеры плазматических мембран растительных клеток	84
7.2. Выделение плазматических мембран с помощью распределения в водной двухфазной системе	85
7.3. Выделение и идентификация тонопластов	85
7.4. Тонопластные везикулы, обладающие транспортной активностью (замкнутые везикулы)	87
7.5. Выделение тонопластной и плазматической мембран с помощью последовательного центрифугирования в градиентах плотности сахарозы и глицерола	87
7.6. Разделение плазматической мембраны и тонопласта с помощью электрофореза в свободном потоке	89
8. Митохондрии	89
9. Эндоплазматический ретикулум	91
10. Аппарат Гольджи	93
11. Пластиды	94
11.1. Хлоропласты	94
11.2. Субфракции хлоропластов	95
11.3. Этиопласты	96
11.4. Субфракционирование этиопластов	97
11.5. Амилопласты	97
11.6. Хромопласты	98
11.7. Пластоглобулы	99
12. Ядра и ядерные оболочки	99
12.1. Ядерные оболочки	100
12.2. Хроматин и ядрышко	100
13. Микротельца	101
14. Окаймленные везикулы	102
15. Заключительные замечания	102
Литература	103

Глава 3. Иммунологические методы исследования мембран. Элейн М. Бейлез, Питер Дж. Ричардсон, Дж. Пол Лузио

1. Введение	109
2. Получение поликлональных и моноклональных антител к компонентам мембран	109
2.1. Достоинства и недостатки поликлональных и моноклональных антител	109
2.2. Иммунизация животных для получения поликлональных антител	111
2.3. Получение моноклональных антител	112
2.4. Скрининг моноклональных антител	113
3. Иммуноблоттинг и анализ эпитопов	123
4. Иммунологическая очистка субклеточных фракций	127
4.1. Антитела, используемые при субклеточном фракционировании	128
4.2. Носители для иммуноаффинного субклеточного фракционирования	131

4.3. Практические вопросы и возможности применения иммуно-аффинного выделения клеточных органелл	132
5. Иммунологическое выделение мембранных компонентов	134
5.1. Солюбилизация мембранных белков	134
5.2. Очистка мембранных белков на иммуносорбентах	137
6. Использование антител для отбора комплементарных ДНК, кодирующих мембранные белки	141
6.1. Фаговые векторы	142
6.2. Плазмидные векторы	142
6.3. Скрининг	143
6.4. Перспективы	145
7. Благодарности	146
Литература	146

Глава 4. Разделение и анализ липидных компонентов мембран. *Джоан А. Хиггинс* 150

1. Введение	150
2. Экстракция липидов	151
2.1. Растворители и аппаратура	151
2.2. Экстракция осадка мембран или небольших объемов концентрированных суспензий	152
2.3. Подкисление растворителя для липидной экстракции	153
2.4. Экстракция больших объемов мембранной суспензии	153
2.5. Удаление растворителя из липидного экстракта	154
3. Разделение липидов по классам	156
3.1. Общие вопросы применения ТСХ	157
3.2. Системы растворителей для разделения мембранных липидов	160
3.3. Разделение полифосфоинозитидов и их производных	165
3.4. Обнаружение липидов на пластинках для ТСХ	169
4. Количественное определение липидов после разделения их с помощью ТСХ	171
4.1. Элюирование липидов	171
4.2. Определение фосфолипидов	172
4.3. Определение сложных эфиров	174
4.4. Определение холестерина и его эфиров	175
4.5. Определение свободных жирных кислот	176
5. Исследование трансмембранного распределения липидов	177
5.1. Мембранные препараты	178
5.2. Проницаемость микросомной мембраны	178
5.3. Сохранение структурной организации микросомных мембран	182
6. Определение трансмембранного распределения фосфолипидов с помощью гидролитических ферментов	184
6.1. Общие принципы	184
6.2. Фосфолипазы	184
6.3. Методика	184
7. Выяснение трансмембранного распределения фосфолипидов с помощью химических модифицирующих реагентов	186
7.1. Принцип метода	186
7.2. Методика	187
8. Выяснение трансмембранного распределения фосфолипидов с помощью фосфолипидобменивающих белков	188
8.1. Принцип метода	188
8.2. Белки, участвующие в обмене фосфолипидов	188
8.3. Акцепторные мембраны	189
8.4. Радиоактивное мечение донорной мембраны	189
8.5. Приготовление липосом	190

9. Изучение биосинтеза, круговорота и внутриклеточного транспорта мембранных фосфолипидов	192
9.1. Включение меченых предшественников в фосфолипиды	192
9.2. Определенные локализации новосинтезированных фосфолипидов	194
Литература	194
Глава 5. Солюбилизация и реконструкция мембранных белков. Оуэн Т. Джонс, Юли П. Эрнест, Марк Дж. Мак-Нэми	196
1. Введение	196
2. Солюбилизация мембранных белков	198
2.1. Критерии солюбилизации	198
2.2. Выбор детергента	202
2.3. Факторы, влияющие на стабильность солюбилизованных мембранных белков	208
2.4. Солюбилизация и очистка никотинного ацетилхолинового рецептора из <i>Torpedo californica</i>	213
3. Общая стратегия реконструкции мембранных белков	214
3.1. Общие методы реконструкции	214
3.2. Морфологическая характеристика везикул	218
3.3. Факторы, определяющие морфологию реконструированных мембран	221
3.4. Характеристика реконструированных везикул	226
3.5. Реконструкция ацетилхолинового рецептора	231
4. Определение функциональной активности реконструированных мембран	232
4.1. Определение связывания и ферментативной активности	232
4.2. Методы регистрации транспорта и проницаемости	239
4.3. Общие замечания	245
5. Новые возможности применения реконструированных мембран	246
5.1. Использование реконструированных мембран для изучения структуры белков	246
6. Заключительные замечания	247
Литература	248
Глава 6. Выделение и модификация мембранных белков и пептидов. Джон Б. Финдлей	251
1. Введение	251
2. Солюбилизация мембранных белков	251
2.1. Периферические белки	252
2.2. Интегральные белки	252
3. Хроматографическое разделение белков	256
3.1. Разделение по размеру	256
3.2. Разделение по заряду	259
3.3. Гидрофобная хроматография	262
3.4. Аффинная хроматография	264
4. Гель-электрофорез	270
4.1. Извлечение белка из геля	271
5. Анализ мембранных белков	273
5.1. Расщепление белка	275
5.2. Определение концентрации белка	277
6. Ковалентная модификация белков	279
6.1. Реагенты, модифицирующие поверхностные белки	280
6.2. Гидрофобные реагенты	288
6.3. Амфифильные реагенты	289
6.4. Сшивающие реагенты	291
7. Радиационная инактивация	301
8. Заключение	303
Литература	303

Глава 7. Оптическая спектроскопия биологических мембран. К. Линд-сей Башфорд	308
1. Введение	308
2. Постановка эксперимента	310
2.1. Оборудование	310
2.2. Выбор хромофора	313
2.3. Характеристика и калибровка оптических сигналов	315
2.4. Артефакты	315
2.5. Низкотемпературная спектроскопия	319
3. Примеры	320
3.1. Окислительно-восстановительное состояние митохондрий <i>in situ</i>	320
3.2. Мембранный потенциал органелл и клеток	323
3.3. pH клеточных компартментов	328
3.4. Поверхностный потенциал мембран	335
4. Перспективы	336
5. Благодарности	336
Литература	336
Глава 8. Биофизические подходы к изучению биологических мембран. Дитер Шуберт	339
1. Введение	339
2. Размеры, форма и конформация мембранных белков и их комплексов	339
2.1. Молекулярная масса мономерных белков или субъединиц	340
2.2. Молекулярная масса белковых комплексов	340
2.3. Размеры молекул	344
2.4. Конформация полипептидной цепи	348
2.5. Подвижность участков белковой молекулы	353
3. Структура липидов в составе биологических мембран и модельных систем	353
3.1. Обнаружение фазовых переходов	354
3.2. Структура фаз	356
3.3. Разделение фаз и доменная структура	361
3.4. Подвижность углеводородных «хвостов» липидных молекул	363
4. Вращательная, латеральная и трансбиллоидная диффузия белков и липидов	365
4.1. Вращательная диффузия белков	365
4.2. Вращательная диффузия липидов	369
4.3. Латеральная диффузия белков	370
4.4. Латеральная диффузия липидов	371
4.5. Трансбиллоидная диффузия липидов	373
5. Взаимодействия белок — липид	376
5.1. Характеристика белково-липидного связывания	376
5.2. Влияние липидов на структуру белка	382
5.3. Влияние белка на структуру и подвижность липидов	383
6. Перспективы	385
7. Благодарности	385
Литература	386
Приложение I. Свойства материалов, используемых для разделения в градиенте плотности	390
Литература	393
Приложение II. Ферменты — маркеры субклеточных фракций	394
Литература	395

Приложение III. Анализ рецепторов. А. Сивапрадарао, Джон Б. Финд-лей	396
1. Мембраносвязанные рецепторы	396
1.1. Реагенты	397
1.2. Методика	397
2. Растворимые рецепторы	398
2.1. Реагенты	398
2.2. Методика	399
Литература	399
Приложение IV. Реагенты, используемые для модификации белков	400
Литература	402
Приложение V. Электрофорез со сдвигом заряда	403
Методика	403
Литература	404
Приложение VI. Анализ инозитолфосфатов методом ВЭЖХ	405
Литература	406

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва
1-й Рижский пер., д. 2
издательство «Мир»

Научное издание

К. Линдсей Башфорд, Элейн М. Бейлез,
Оуен Т. Джонс и др.

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ.
МЕТОДЫ**

Под ред. Дж. Б. Финдлея, У. Г. Эванза

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев
Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова
Ст. научн. редактор Н. Н. Шафрановская
Мл. редактор О. В. Шагинян
Художник А. В. Захаров
Художественный редактор А. Я. Мусин
Технический редактор И. И. Володина
Корректор С. А. Денникова

ИБ № 7117

Сдано в набор 30.11.89. Подписано к печати 12.04.90.
Формат 60×90^{1/16}. Бумага типографская № 1. Печать
высокая. Гарнитура Литературная. Объем 13,25 бум. л.
Усл. печ. л. 26,5. Усл. кр.-отт. 26,5. Уч.-изд. л. 30,55.
Изд. № 4/6533. Тираж 7100 экз. Зак. 1488. Цена 3 р. 90 к.

Издательство «Мир»

В/О «Совэкспорткнига» Государственного комитета СССР
по печати.

129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Государственного
комитета СССР по печати.

113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.